

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Nuevas aportaciones de fosfomicina frente a
Pseudomonas aeruginosa: caracterización
fenotípica y molecular de la resistencia,
asociaciones antibióticas y modelos de
biopelículas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Díez Aguilar

DIRECTORES

**María Isabel Morosini Reilly
Rafael Cantón Moreno**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID -

Facultad de Farmacia -

Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**“NUEVAS APORTACIONES DE FOSFOMICINA FRENTE A
Pseudomonas aeruginosa. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y
MOLECULAR DE LA RESISTENCIA, ASOCIACIONES ANTIBIÓTICAS
Y MODELOS DE BIOPELÍCULAS”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR -

PRESENTADA POR -

MARÍA DÍEZ AGUILAR

DIRECTORES -

Dra. María Isabel Morosini Reilly -

Dr. Rafael Cantón Moreno -

Madrid, 2016

La Dra. **María Isabel Morosini Reilly**, Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid

El Dr. **Rafael Cantón Moreno**, Jefe de Servicio del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid,

CERTIFICAN QUE:

MARÍA DÍEZ AGUILAR ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor, con el título:

“NUEVAS APORTACIONES DE FOSFOMICINA FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA, ASOCIACIONES ANTIBIÓTICAS Y MODELOS DE BIOPELÍCULAS”

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Madrid, 2016

Fdo.: Dra. María Isabel Morosini Reilly

Fdo.: Dr. Rafael Cantón Moreno



A Emin

A mis padres, a mis hermanos

***“No hay nada más hermoso que vivir rodeado de gente positiva y recordar
que nunca entra la oscuridad donde hay luz”***

Norma Matellevsky

***“El hombre no es más que el producto de sus pensamientos. Se
convierte en lo que piensa”***

Mahatma Gandhi

“El ignorante afirma, el sabio duda y reflexiona”

Aristóteles

Me siento muy afortunada de estar rodeada de gente tan buena, de la que he recibido tanto apoyo y cariño. Esta tesis está dirigida a todos vosotros.

Especialmente quiero dar las gracias a la Dra. María Isabel Morosini, por haber estado siempre a mi lado, por haberme guiado y enseñado tan bien la microbiología. Gracias a ella tengo esta tesis escrita. Creíste en mí y siempre te lo agradeceré. Tú, desde luego, eres una “lucecita” muy importante en mi camino.

Muchas gracias al Dr. Rafael Cantón, por todo lo aprendido. Por haberme enseñado a crecer y por contagiarme el entusiasmo por el trabajo. Por haber encontrado siempre tiempo para ayudarme y apoyarme.

Gracias a las personas del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, compañeros y amigos con los que vivo el día a día. Con los que me he sentido como en familia desde el principio,

A Ana Sánchez, por ser una persona tan especial para mí. Sin tus abrazos todo sería distinto. Gracias por darme tanto y por tener un corazón de oro.

A “mis CoR”, Juande, e Irene Merino, por ser los mejores “CoR” que se puede tener. Todos estos años a vuestro lado han sido un lujo, formamos un equipo envidiable!

A Bea Romero, por transmitirme siempre tan buena energía y por haber compartido tantos momentos bonitos. Qué bien tenerte cerca!

A Ana Sofía e Irene Rodríguez, por ayudarme tanto con esta tesis y siempre con una sonrisa. Valéis mucho, como amigas y maestras.

A María Gálvez, por arroparme y aconsejarme siempre con amor de madre.

A Desirée por su alegría y fortaleza, para mí has sido todo un ejemplo.

A “mis Resis”, mayores y pequeños. En especial a Ana Luisa, Claudio, Adri, María Bordallo, Rubén, Lorena, Sergio, y Laurita, por todos los buenos momentos y las risas compartidas.

A la Dra. María Antonia Meseguer, y al Dr. Enrique Gómez Mampaso, su ilusión por este trabajo ha dejado huella en mí para siempre.

A Esther Torrecilla y a Ana Moreno, por su predisposición, ayuda y por trabajar tan bien y hacer todo tan fácil.

A Rosa del Campo, por tener siempre tan buen carácter y palabras de apoyo cuando más se necesitan.

A todos los compañeros de investigación, María García, Marta Hernández, Marta Cobo..., a los facultativos, a M^a José, Lourdes, Paqui, Maribel, Isabel, Laura... y a todos con los que he tenido la oportunidad de trabajar en estos años, gracias por todo lo que me aportáis.

Zerrin Aktaş'a, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışma fırsatı verdiği ve burada yaptığı yardımlar için, ayrıca ısrar edildiğinde o konuda ilerleme sağlandığını gösterdiği için teşekkür ederim.

A la *Fundación Francisco Soria Melguizo*, por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A Carolina Navarro, por ser tan buena amiga y estar cerca siempre. Cuánto me han animado esos paseos por el parque!, muchas gracias Carolinuxi!

A mis amigas de Segovia y amigos de la facultad, "los boticarios", gracias por acompañarme en la vida.

Y a los más importantes, mi familia:

A mis padres, Isabel y Javier, por ser tan buenos padres, por todo su cariño, por quererme tanto, y haberme enseñado a vivir, sois mi ejemplo de constancia, paciencia, amor y sabiduría. Todo lo que pueda escribir aquí es poco. A mis hermanitos, Joaquín y Ana, con los que he crecido, aprendido, disfrutado, llorado y reído, me habéis enseñado que somos capaces de realizar todo aquello que nos sale del corazón.

A mi abuelo, porque de él aprendí la importancia de hacer las cosas bien. Y a mi abuela, porque siempre he sido su morena querida.

A Emin, por ser el gran pilar de mi vida, por la confianza y el amor que me transmites, contigo al lado siempre he sentido que todo va a salir bien.

Os quiero muchísimo,

María

ÍNDICE -

<u>RESUMEN</u>	29 -
<u>SUMMARY</u>	33 -
<u>INTRODUCCIÓN</u>	39 -
1-Fosfomicina	41 -
1.1-Mecanismo de acción	42 -
1.2-Características farmacocinéticas-farmacodinámicas	42 -
1.3-Uso clínico de fosfomicina	44 -
1.3.1-Uso de fosfomicina para el tratamiento de la infección urinaria	44 -
1.3.2-Uso de fosfomicina en las infecciones no urinarias	44 -
1.3.3-Uso de fosfomicina por vía inhalada	45 -
1.4-Efecto inmunomodulador	46 -
1.5-Mecanismos de resistencia	47 -
1.5.1-Modificación de la diana MurA	47 -
1.5.2-Modificación e inactivación antibiótica	47 -
1.5.3-Reducción de la permeabilidad	48 -
1.6-Determinación de la sensibilidad <i>in vitro</i> a fosfomicina	53 -
2-<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57 -
2.1-Características generales	57 -
2.2-Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i>	57 -
2.3-Factores de virulencia	59 -
2.4-Crecimiento en forma de biopelículas	61 -
2.5-Contexto genómico	66 -
2.6-Resistencia a antibióticos	66 -
2.6.1-Resistencia a antibióticos β -lactámicos	67 -
2.6.2-Resistencia a fluoroquinolonas	69 -
2.6.3-Resistencia a aminoglucósidos	69 -

2.7-Problema epidemiológico de la multirresistencia en <i>P. aeruginosa</i>	70 -
3-Concepto de hipermutación	73 -
4-Concepto de concentración preventiva (CPM) de mutantes y ventana de - selección (VSM)	74 -
5-Concepto de punto de corte epidemiológico (ECOFF)	75 -
6-Concepto de sinergia antibiótica -curvas de muerte-	76 -
<u>PLANTEAMIENTO E HIPÓTESIS DEL TRABAJO</u>	77 -
<u>CAPÍTULO 1º</u>	79 -
1-OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 1º	83 -
2-MATERIAL Y MÉTODOS	84 -
2.1-Cepas estudiadas	84 -
2.2-Estudio <i>in vitro</i> de la sensibilidad antibiótica de <i>P. aeruginosa</i> a fosfomicina.....	84 -
2.2.1-Métodos de dilución	85 -
2.2.2-Métodos de difusión	85 -
2.3-Estudio del mecanismo de resistencia a fosfomicina en <i>P. aeruginosa</i> mediado por el gen <i>glpT</i> . Amplificación y secuenciación de <i>glpT</i>	86 -
2.4-Análisis de los resultados	87 -
3-RESULTADOS	90 -
3.1-Distribuciones de los valores de CMI de fosfomicina para <i>P. aeruginosa</i>	90 -
3.2-Validación de un inóculo alternativo para determinar la sensibilidad de - <i>P. aeruginosa</i> a fosfomicina con los métodos de difusión	94 -
3.3-Efecto del medio utilizado para determinar la CMI a fosfomicina en - <i>P. aeruginosa</i>	101 -
3.4-Cálculo de la CMI en Muller-Hinton suplementado con glicerol	102 -
4-DISCUSIÓN	105 -
ANEXO 1	109 -

ANEXO 2	115 -
<u>CAPÍTULO 2º</u>	121 -
1-OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 2º	125 -
2-MATERIAL Y MÉTODOS	126 -
2.1-Cepas estudiadas	126 -
2.2-Determinación de la sensibilidad <i>in vitro</i>	126 -
2.3-Estudio de sinergia antibiótica mediante curvas de muerte bacteriana	127 -
2.4-Determinación de la concentración preventiva de la aparición de mutantes - (CPM) y de la ventana de selección de la aparición de mutantes (VSM)	129 -
2.5-Detección de cepas hipermutadoras	131 -
2.6-Estudio del mecanismo de resistencia de <i>P. aeruginosa</i> a fosfomicina Amplificación y secuenciación de <i>glpT</i>	131 -
2.7-Estudio de la resistencia a aminoglucósidos	132 -
3-RESULTADOS	133 -
3.1-Curvas de muerte bacteriana	133 -
3.1.1-Experimento 1: Combinación de fosfomicina y aztreonam	133 -
3.1.2-Experimento 2: Combinación de fosfomicina y meropenem	134 -
3.1.3-Experimento 3: Combinación de fosfomicina y ciprofloxacino	135 -
3.1.4-Experimento 4: Combinación de fosfomicina y colistina	136 -
3.1.5-Experimento 5: Combinación de fosfomicina y tobramicina	137 -
3.2-Concentración que previene la aparición de mutantes	139 -
3.3-Detección del fenotipo hipermutador	142 -
3.4-Characterización de los mecanismos de resistencia	142 -
3.4.1- Caracterización de la resistencia a tobramicina	142 -
3.4.2-Bases moleculares implicadas en la resistencia a fosfomicina. - Modelización proteica del transportador GlpT	143 -
5-DISCUSIÓN	147 -

ANEXO 3	153 -
<u>CAPÍTULO 3º</u>	163 -
1-OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 3º	167 -
2-MATERIAL Y MÉTODOS	168 -
2.1- Cepas estudiadas	168 -
2.2-Determinación de la actividad de fosfomicina, tobramicina y de la - combinación fosfomicina-tobramicina sobre biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> mediante el modelo <i>in vitro</i> de CALGARY	168 -
2.3-Determinación de la actividad de fosfomicina, tobramicina y de la - combinación fosfomicina-tobramicina sobre biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> con - el sistema de microfluídica BIOFLUX	173 -
3-RESULTADOS	176 -
3.1-Resultados obtenidos con el sistema cerrado CALGARY	176 -
3.2-Resultados obtenidos con el sistema abierto BIOFLUX	180 -
3.2.1 RESULTADOS PARA EL AISLADO <i>Pab1</i>	181 -
3.2.2 RESULTADOS PARA EL AISLADO <i>Pab2</i>	182 -
3.2.3-RESULTADOS PARA EL AISLADO <i>Pab3</i>	183 -
3.2.4-RESULTADOS PARA EL AISLADO <i>Pab4</i>	184 -
3.2.5-RESULTADOS PARA EL AISLADO <i>Pab5</i>	185 -
3.2.6-RESULTADOS PARA EL AISLADO <i>Pab6</i>	186 -
3.2.7-RESULTADOS PARA EL AISLADO ATCC 27853	187 -
4-DISCUSIÓN	188 -
<u>EPÍLOGO</u>	193 -
<u>CONCLUSIONES</u>	197 -
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	201 -

ÍNDICE DE FIGURAS -

Figura 1: Estructura química de fosfomicina y de sus formulaciones para la administración por vía intravenosa (fosfomicina disódica) y por vía oral (fosfomicina cálcica y fosfomicina trometamol)

Figura 2: Mecanismo de acción de la fosfomicina

Figura 3: Efectos de fosfomicina sobre el sistema inmunológico

Figura 4: Mecanismo de acción de las distintas enzimas que catalizan la apertura del anillo epóxido de la fosfomicina

Figura 5: Estructura del transportador GlpT

Figura 6: Secuencia de funcionamiento del transportador GlpT

Figura 7: Homología estructural entre la fosfomicina (A) y el glicerol 3-P (B)

Figura 8: Regulación en la expresión del GlpT

Figura 9: Actividad basal de los transportadores GlpT y UhpT y tras la adición al medio de sus respectivos inductores

Figura 10: Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Figura 11: Esquema del proceso de formación de una biopelícula

Figura 12: Modelo cerrado de biofilm-Calgary

Figura 13: Representación de los pocillos de entrada y salida unidos por un microcanal donde tiene lugar la formación de la biopelícula

Figura 14: Esquema de los diferentes mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*

Figura 15: Tasas de multirresistencia de *P. aeruginosa* según la EARS (2013)

Figura 16: Curvas farmacocinéticas por debajo de la CMI, entre la CMI y la CPM y por encima de la CPM

Figura 17: Distribución de la CMI de fosfomicina para *P. aeruginosa*, con un valor de ECCOF de 128 mg/l, que separa la población salvaje de aquella que posee mecanismos de resistencia

Figura 18: Esquema del tipo de cebadores utilizados para la secuenciación del gen *glpT*

Figura 19: Distribución de CMIs de fosfomicina para las dos poblaciones de *P. aeruginosa* estudiadas

Figura 20: Distribución de la CMI de fosfomicina para *P. aeruginosa* obtenida de la base de - datos de EUCAST

Figura 21: Análisis gráfico de Bland-Altman: concordancia entre la microdilución y la dilución en agar

Figura 22: Distribución de la CMI de fosfomicina para *P. aeruginosa* realizado por dilución en agar suplementado con glucosa 6-P y sin glucosa 6-P

Figura 23: Efecto del uso de distintos inóculos para determinar la sensibilidad a fosfomicina por Etest y por discos

Figura 24: Análisis gráfico de Bland-Altman: concordancia entre la dilución en agar y el Etest realizado con dos concentraciones de inóculo: 10^8 UFC/ml y 10^6 UFC/ml

Figura 25: Gráficas de regresión: demostración de la asociación lineal entre las CMI obtenidas con la dilución en agar y el diámetro del halo de inhibición (mm) resultante de los discos realizados con un inóculo de 10^8 UFC/ml (A) y de 10^6 UFC/ml (B)

Figura 26: Etest y difusión con discos de fosfomicina realizados con un inóculo de 10^8 UFC/ml (A) y 10^6 UFC/ml (B) en una cepa con CMI (agar) de 64 mg/l

Figura 27: Distribución de las CMIs de fosfomicina determinadas con agar Muller-Hinton (MH) - y con agar nutritivo (AN) -

Figura 28: Valores de CMIs obtenidos por Etest para las diferentes cepas (*Pa1-Pa9*) utilizando - Muller-Hinton sin glicerol (SG) y Muller-Hinton suplementado con 0.1mM y 10 mM de glicerol -

Figura 29: Diferencia de elipses y halos de inhibición obtenidos con el medio Muller-Hinton - suplementado con 0.1mM (A) o 10mM (B) de glicerol: ejemplo con 3 cepas de *P. aeruginosa*

Figura 30: Esquema de las concentraciones de antibiótico y de las condiciones utilizadas para la determinación de las concentraciones preventivas de mutantes -

Figura 31: Esquema del protocolo utilizado para la determinación de la concentración - preventiva de mutantes (CPM) -

Figura 32: Curvas de muerte obtenidas con la combinación de fosfomicina y aztreonam -

Figura 33: Curvas de muerte obtenidas con la combinación de fosfomicina y meropenem -

Figura 34: Curvas de muerte obtenidas con la combinación de fosfomicina y - ciprofloxacino

Figura 35: Curvas de muerte obtenidas con la combinación de fosfomicina y colistina

Figura 36: Curvas de muerte obtenidas para la combinación de fosfomicina y tobramicina en los 8 aislados de *P. aeruginosa*.

Figura 37: Representación gráfica de la CMI y CPM (ventana de selección) para la combinación de fosfomicina y tobramicina en aerobiosis (AE) y anaerobiosis (ANA)

Figura 38: Representación tridimensional de la proteína transportadora GlpT en la cepa de referencia PAO1 y en los mutantes resistentes a fosfomicina

Figura 39: Esquema del procedimiento seguido para la determinación de la actividad de un antibiótico sobre *biofilm* con el método Calgary

Figura 40: Esquema la placa de microtitulación utilizada con el método Calgary

Figura 41: Esquema seguido para la determinación de la concentración preventiva de aparición de *biofilm*

Figura 42: Esquema de la placa de 48 pocillos de BIOFLUX utilizada para la formación de 24 biopelículas

Figura 43: Sistema Bioflux, utilizado para los experimentos abiertos de formación de biopelículas

Figura 44: Diferencia de DO (ΔDO) \pm la desviación estándar (DE) medidas a 450 nm obtenidas para cada aislado

Figura 45: Esquema en el que se representan las CMIB de fosfomicina, tobramicina y la combinación fosfomicina-tobramicina

Figura 46: Resultados obtenidos con Bioflux para el aislado *Pab1*

Figura 47: Resultados obtenidos con Bioflux para el aislado *Pab2*

Figura 48: Resultados obtenidos con Bioflux para el aislado *Pab3*

Figura 49: Resultados obtenidos con Bioflux para el aislado *Pab4*

Figura 50: Resultados obtenidos con Bioflux para el aislado *Pab5*

Figura 51: Resultados obtenidos con Bioflux para el aislado *Pab6*

Figura 52: Resultados obtenidos con Bioflux para el aislado ATCC 27853

ÍNDICE DE TABLAS -

Tabla 1: Principales infecciones causadas por *P. aeruginosa* y los factores de riesgo - relacionados -

Tabla 2: Fenotipos de resistencia a β -lactámicos resultantes de los diferentes - sistemas de expulsión activa y por la alteración en la permeabilidad mediada por - la porina OprD. -

Tabla 3: Fenotipos de resistencia de a aminoglucósidos y fluoroquinolonas en *P. aeruginosa*

Tabla 4: Cebadores y condiciones utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *glpT*

Tabla 5: Valores de concordancia entre la dilución en agar (método de referencia) - y la microdilución y el Etest -

Tabla 6: Correlación entre el Etest realizado con un inóculo de 10^6 UFC/ml y 10^8 UFC/ml con la - dilución en agar -

Tabla 7: Puntos de corte (EUCAST) para los distintos antibióticos utilizados -

Tabla 8: Combinaciones de antibióticos utilizadas (ATB1, ATB2) con sus respectivas CMI (mg/l) - para la realización de las curvas de muerte -

Tabla 9: Combinaciones de fosfomicina y tobramicina utilizadas con sus respectivas CMI (mg/l) para la realización de las curvas de muerte en el experimento 5 -

Tabla 10: Concentración máxima sanguínea correspondiente a cada antibiótico utilizada en los - experimentos de curvas de muerte bacteriana -

Tabla 11: Resultados de CMI y de CPM de fosfomicina y tobramicina obtenidos tanto en - aerobiosis como en anaerobiosis -

Tabla 12: Detección de subpoblaciones mutantes para los distintos antibióticos -

Tabla 13: Mutaciones en la secuencia del gen *glpT* obtenidas en las cepas originales (*Pa2*, *Pa4*, *Pa5*, *Pa7*, *Pa8*) y en sus mutantes resultantes de los ensayos de CPM (*Pa2M*, *Pa4M*, *Pa5M*, *Pa7M*, *Pa8M*), así como en las cepas adicionales con distintas CMI para fosfomicina (*Pa9*-*Pa14*). -

Tabla 14: Polimorfismo del gen *glpT* implicado en la resistencia a fosfomicina. -

Tabla 15: Características de los aislados utilizados para los ensayos de formación de *biofilm*

Tabla 16: Esquema del protocolo seguido para la formación de biopelículas con el sistema - Bioflux

Tabla 17: Resultados de CIF de la combinación de fosfomicina-tobramicina para cada concentración fija de tobramicina

Tabla 18: Valores de CMEB y CMBB obtenidos para la fosfomicina y la tobramicina y para las combinaciones

Tabla 19: CPB e índices CPB/CMI obtenidos para cada aislado

Tabla 20: Porcentaje de biofilm formado por cada cepa en los tiempos establecidos

Tabla 21: Valor de p obtenido para cada antibiótico según el test de Mann–Whitney

LISTADO DE ABREVIATURAS -

AAC: Acetiltransferasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AE: Aerobiosis

AK: Amicacina

AN: Agar nutritivo

ANA: Anaerobiosis

ANT: adeniltransferasa

APH: fosforiltransferasa

ARN: Ácido ribonucleico

ASM: Sociedad Americana de Microbiología

ATB: Antibiótico

ATCC: *American Type Culture Collection*

AUC: Área bajo la curva

ATM: Aztreonam

BLEE: β -lactamasa de espectro extendido

CAZ: Ceftazidima

CCI: Coeficiente de correlación intraclase

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CEPA: Compañía Española de Penicilina y Antibióticos

CIF: Concentración Inhibitoria Fraccionada

CIP: Ciprofloxacino.

CIR: CMI de la subpoblación resistente

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

C_{max}: Concentración máxima

CMBB: Concentración mínima bactericida del biofilm

CMEB: Concentración mínima que erradica el biofilm

CMI: Concentración mínima inhibitoria -

CMIB: Concentración mínima inhibitoria del biofilm

CN: Gentamicina

CPB: Concentración que previene la aparición de *biofilm*

CPE: Cefepima

CPM: Concentración que previene la aparición de mutantes

DE: Desviación estándar

DO: Densidad óptica

EARs: *European Antimicrobial Resistance Surveillance*

ECOFF: Punto de corte epidemiológico o

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

EUCAST: *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

FOS: Fosfomicina

FQ: Fibrosis quística

FT: Fosfomicina-tobramicina

GlpT: transportador del glicerol 3-fosfato

I: Intermedio

IC: Intervalo de confianza

IL: Interleucina

I_{max}: Intensidad máxima

IMI: Imipenem

I_{min}: Intensidad mínima

ITU: Infecciones del tracto urinario

LPS: lipopolisacárido

MBL: Metallo-β-lactamasa

MERO: Meropenem

MFS: Superfamilia principal de transportadores facilitadores

MH: Muller-Hinton -

MLST: *Multilocus sequence typing*

MurA: UDP-N-acetilglucosamina-enolpiruvil transferasa

NAV: Neumonía asociada a ventilación mecánica

NCCLS: *National Committee on Clinical Laboratory Standards*

NT: Netilmicina

P/TZ: Piperacilina/tazobactam

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: *Pulsed field gel electrophoresis* (campo pulsado)

PK/PD: Índice farmacocinético/farmacodinámico

PVC: Policloruro de vinilo

R: Resistente

S: Sensible

SARM: *S. aureus* resistente a meticilina

T/TZ: Ticarcilina/tazobactam

T: tiempo

TBE: Tampón Tris Borato-EDTA

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TOB: Tobramicina

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UFC: Unidades formadoras de colonia

UhpT: transportador de la glucosa 6-fosfato

VSM: Ventana de selección de mutantes

RESUMEN -

La fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro de acción que se ha utilizado ampliamente por vía oral para el tratamiento de infecciones urinarias, mientras que su uso por vía intravenosa ha sido limitado. En la era de la multirresistencia bacteriana a los antibióticos, el uso de fosfomicina se ha revalorizado, planteándose su uso en el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* cuando las opciones terapéuticas son escasas. Sin embargo, el conocimiento clínico y microbiológico sobre su actividad frente a este microorganismo es limitado. Por ello, el objetivo principal del trabajo fue estudiar su acción *in vitro*, mediante la determinación de sensibilidad con diferentes métodos y de la actividad con asociaciones antibióticas, la caracterización molecular de la resistencia y la realización de modelos de biopelículas.

En el **primer capítulo** se determinó la correspondencia entre los métodos de microdilución, difusión con discos y tiras en gradiente de concentración, con el método de referencia de dilución en agar, para la determinación de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a fosfomicina. Mientras que para la microdilución se observaron datos aceptables de concordancia (**acuerdo esencial** del 84% y **acuerdo de categoría** del 89.3%), los datos de los métodos de difusión reflejaron una débil concordancia. Por ello se planteó la utilización de un inóculo alternativo (10^6 UFC/ml) para las tiras en gradiente que mejoró los datos de **acuerdo esencial** (de un 67.6% a un 93.6%) y **de acuerdo de categoría** (de un 78.2% a un 95%) y para los discos donde el índice de Spearman pasó de ser del -0.71 al -0.81. Se demostró que la adición de glucosa 6-P al medio no está justificada en *P. aeruginosa*, ya que este microorganismo carece del transportador UhpT y las CMI en medio con y sin glucosa 6-P fueron similares.

En el **segundo capítulo** se determinó la actividad de fosfomicina asociada con diferentes antibióticos por curvas de muerte bacteriana y por concentración preventiva de mutantes y ventanas de selección en ambiente aeróbico y anaeróbico. La mayor actividad sinérgica se observó con la asociación con tobramicina en aislados de muestras respiratorias de fibrosis quística con CMI en el límite de la sensibilidad (4 mg/l) con mutaciones en el gen *mexZ*. La asociación de fosfomicina y tobramicina en aislados sensibles a ambos antibióticos ha demostrado ser sinérgica y potenciar el efecto bactericida, así como evitar la aparición de mutantes resistentes tanto en aerobiosis como anaerobiosis. En este capítulo se describe que las mutaciones en el gen *glpT* causan resistencia a fosfomicina en *P. aeruginosa* y que los aislados con CMI igual o por debajo del ECOFF (128 mg/l) no presentan mutaciones en el gen *glpT*, lo que demuestra que forman parte de la población salvaje.

En el **tercer capítulo** se evaluó la acción de la combinación de fosfomicina y tobramicina utilizando dos modelos *in vitro* de formación de biopelículas con aislados de *P. aeruginosa* procedentes de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística. El **modelo cerrado de Calgary** permitió el cálculo de distintos parámetros farmacodinámicos y coeficientes de sinergia, que se aplicaron posteriormente al modelo abierto Bioflux. Se ha demostrado por tanto que los métodos abiertos y cerrados pueden ser complementarios. Se observó que fosfomicina no es capaz de inhibir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* ni de erradicarlas una vez establecidas. Sin embargo, su asociación con tobramicina ha demostrado ser sinérgica en la inhibición del *biofilm*. En el modelo abierto se observó que la combinación de fosfomicina-tobramicina consigue el mismo efecto que la tobramicina sola, pero con una concentración menor de tobramicina. Bioflux es un sistema que se presenta como una herramienta muy útil a la hora de realizar modelos abiertos de *biofilm* de alto rendimiento.

SUMMARY -

“NEW APPROACHES IN THE USE OF FOSFOMYCIN AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*: PHENOTYPIC AND MOLECULAR RESISTANCE CHARACTERIZATION, ANTIBIOTIC ASSOCIATIONS AND BIOFILM MODELS”

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for a wide variety of infections. Its high intrinsic and acquired antimicrobial resistance combined with the ability to produce biofilms makes the treatment of these infections a critical challenge. This situation has forced researchers to look for new therapeutic strategies to treat these infections.

Fosfomycin shows no cross-resistance with other antimicrobials and has demonstrated safety and efficacy over a broad range of infections and organisms. Its association with other antipseudomonal agents may be an option for the treatment of infections caused by this pathogen. However, studies documenting the *in vitro* and *in vivo* activity of fosfomycin against *P. aeruginosa* remain scarce.

For *in vitro* susceptibility testing, agar dilution is considered the reference method but automatic microdilution and diffusion methods (disks and MIC gradient strips), widely used in clinical laboratories, have not been evaluated and clinical breakpoints have not been established. EUCAST includes an epidemiological cutoff value (ECOFF) of 128 mg/l.

Fosfomycin inhibits bacterial cell wall biosynthesis by inactivating the UDP-*N*-acetylglucosamine-3-*o*-enolpyruvyltransferase. In the case of *P. aeruginosa*, this compound exclusively enters into bacterial cells through the glycerol-3-phosphate nutrient transporter (GlpT). Molecular mechanisms implicated in the inactivation of this permease and consequently in fosfomycin resistance are not widely studied.

The high mutational rate of *P. aeruginosa* to fosfomycin (10^{-6}) makes necessary its administration in combination with other antimicrobials. Synergy between fosfomycin and other antibiotics, as colistin, piperacillin-tazobactam, carbapenems or aminoglycosides using checkerboards and time-kill assays has been reported. Fosfomycin and tobramycin combination (FT) has been demonstrated to be beneficial, since fosfomycin enhances the active uptake of tobramycin into *P. aeruginosa*, resulting in greater inhibition of protein synthesis and enhanced bacterial killing. Indeed this combination is being developed as an inhaled antibiotic therapy for cystic fibrosis.

Objectives -

The **objectives** of this work were: **1)** To evaluate the *in vitro* fosfomycin activity against a collection of *P. aeruginosa* isolates by standard broth microdilution, MIC gradient strips, and disk diffusion methods and to compare all methods' performances with that of agar dilution. **2)** To determine the potential synergistic activity of different antimicrobials with fosfomycin by time kill assays. The study of the *in vitro* activity of FT against *P. aeruginosa* clinical isolates assessing the mutant prevention concentration (MPC) and (MSW) values of these antimicrobials alone and in combination, under conditions simulating microaerobic or anaerobic environments that are present in biofilm-mediated infections, were assessed. The *gfpT* gene mutations responsible for fosfomycin resistance in *P. aeruginosa* were determined. **3)** To observe and to describe the dynamics of *P. aeruginosa* biofilm formation in an *in vitro* open model and to compare the results with those of a closed system. The effect of FT on these biofilms was analyzed.

Results

In the first chapter, a collection of non-CF *P. aeruginosa* isolates, carbapenem susceptible and non-carbapenem susceptible, were included. Fosfomycin MICs demonstrated almost identical distributions irrespective of carbapenem susceptibility status and MIC distributions (agar dilution and broth microdilution) were virtually superimposable over those recorded by EUCAST. According to the ECOFF value, 86.4% and 80.6% of isolates were susceptible and 13.6% and 19.4% were resistant to fosfomycin by the agar dilution and broth microdilution methods, respectively. When **broth microdilution was compared with agar dilution**, the EA was 84% and the CA was 89.3%, with a kappa value of 0.65, which indicates "substantial agreement." Rates of very major and major errors were 17.9% and 9.6%, respectively. By using the Bland-Altman analysis, a good agreement between the two methods was corroborated, as the majority of values were distributed between the ± 1 range. Identical MICs were observed by the agar dilution and microdilution methods for the 25 selected isolates and the control strain without supplementation with glucose 6-P.

MICs were also determined by Etest and disk diffusion methods with two different inocula: (i) a standard 1.5×10^8 CFU/ml inoculum (0.5 McFarland) and (ii) a 1:100 dilution (1.5×10^6 CFU/ml) of the standard suspension, which has been considered an alternative inoculum. With the standard inoculum the presence of colonies inside the Etest inhibition

ellipses led to bad rates of concordance, and the colonies of resistant mutants within disk inhibition zones led to unreliable measurements.

Considering the Etest results, EA was 93.6% for MICs performed with 10^6 CFU/ml and 67.6% for the standard inoculum. CA was 95% and 78.2% for the 10^6 CFU/ml inoculum and the 10^8 CFU/ml inoculum, respectively.

Using Bland-Altman analysis, an enhanced level of agreement was also observed with the alternative inoculum, however, with the standard inoculum, plots were distributed in a wide range of values, and the linear fit presented a marked negative slope. Concordance between disk inhibition zone diameters and agar dilution MICs was established by regression slope graphics and the Spearman coefficient, which was - 0.81 for 10^6 CFU/ml and - 0.71 for 10^8 CFU/ml.

In the second chapter, a potential synergistic effect of fosfomycin with other antimicrobials was tested by time kill assays. Aztreonam, ciprofloxacin, colistin and meropenem were used in combination with fosfomycin in *P. aeruginosa* susceptible and resistant to each of these antibiotics. Association with tobramycin was tested in 8 isolates with tobramycin MICs ranging from 1-64 mg/l. All the isolates presented a fosfomycin MIC of 64 mg/l.

Fosfomycin exhibited a bacteriostatic activity, with a 0.2 to 2.15 \log_{10} CFU/ml inoculum reduction in the first 8 h; at 12 to 24 h a regrowth was observed in all the cases when this antimicrobial was used alone.

A synergistic effect was observed with the combination of fosfomycin with meropenem and also with tobramycin. Although the combination with aztreonam was not synergistic, it was favorable as it achieved a complete inhibition of growth at 24 hours. The association with ciprofloxacin or colistin was indifferent. Antagonism was not observed in any case.

A remarkable synergy and bactericidal effect was observed with tobramycin in 2 of the 5 tobramycin susceptible strains, they were isolated from respiratory samples of cystic fibrosis patients (tobramycin MIC=4 mg/l). Alteration of the MexXY efflux system was implicated in low-level aminoglycoside resistance in the two isolates, with *mexZ* being the most commonly mutated gene in cystic fibrosis strains.

A synergistic effect with fosfomycin-tobramycin may not be appreciated in strains with a tobramycin MIC of 1 to 2 mg/ml due to the strong bactericidal effect of this antimicrobial alone. Nevertheless, MIC results obtained in anaerobiosis and MPC results support the use of

the combination for susceptible strains. Tobramycin-susceptible isolates became resistant in anaerobic conditions. Indeed, tobramycin or fosfomycin alone did not prevent the appearance of resistant mutants in aerobiosis or anaerobiosis with very high MPC values, especially for fosfomycin. In contrast, a fosfomycin-tobramycin combination rendered narrow or even null MSWs in aerobic and anaerobic conditions.

When isolates with high-level tobramycin resistance harboring aminoglycoside-modifying enzymes were analyzed, the possibility of using the combination was dismissed, as time-kill assays showed very weak or no synergy with wide MSWs in aerobic and anaerobic environments.

We observed that nucleotide changes in the *glpT* gene sequence are responsible for fosfomycin resistance in *P. aeruginosa*. These changes followed different patterns in each isolate, resulting in various modifications through which the hypothetical permease structure was truncated or significantly modified. As a consequence, uptake of a specific substrate by altered forms of GlpT would be either totally blocked or reduced, concomitantly resulting in high fosfomycin MIC values. None of the strains with MICs below the ECOFF value presented any mutation in their *glpT* gene sequence.

In the third chapter, two *in vitro* models were used to develop *P. aeruginosa* biofilms: a closed system (*Calgary* device) and an open model which is based on microfluidics (*Bioflux*). The *Calgary* device has the advantages of simplicity and applicability in high-throughput analysis while the open systems replicate better the *in vivo* conditions, because of the control of the nutrient delivery, the flow and the temperature.

With both methods the activity of fosfomycin, tobramycin and the FT were tested against 6 *P. aeruginosa* strains isolated from respiratory samples of cystic fibrosis patients. Tobramycin MICs ranged from 0.5-4 mg/l, and all the isolates had a fosfomycin MIC of 64 mg/l. With the *Calgary* device different PD parameters, as the biofilm inhibitory (BIC), bactericidal (BBC), eradication (BEC) and the prevention (BPC) concentrations were obtained. To determine if the combination was synergistic, the fractional inhibitory concentration (FIC) adapted to the BIC was calculated.

With both methods, it was observed that all except one of the isolates formed biofilm.

The BIC range for fosfomycin and tobramycin was 1024->1024 mg/l and 8-32 mg/l respectively. The combination tested in the *Calgary* device behaved as synergistic in all the isolates except in the ATCC 27853 used as the control strain.

Values for BBC and BEC were higher than BICs: 1024->1024 mg/l for fosfomycin and 64->512 mg/l for tobramycin. In this case, the combination was not advantageous, as its BBC and BEC values were similar to those obtained with the tobramycin.

With the *Bioflux*, the dynamics of the biofilm formation for each isolate were observed capturing images at 8 and 24 hours after the bacterial inoculation. The analysis of these images was made using the *Bioflux* software which measures the intensity of color pixels and provides a value. This value is the media of the intensity of the selected area in the microchannel.

The MIC and BIC of each antibiotic was tested in the *Bioflux*. For the combination, the lowest tobramycin concentration that was synergistic with fosfomycin was used.

Considering the total of the isolates, the **Mann–Whitney** test was used to analyze the data. There was a statistically significant difference when comparing the intensity of the inoculum with the intensity in the microchannel where the BIC of tobramycin and fosfomycin or the combination was used ($p < 0.01$) but not when applying the MIC of the antibiotics ($p > 0.01$).

Conclusions

The paucity of therapeutic options against *P. aeruginosa* reinforces the usefulness of routinely determining fosfomycin susceptibility. The overall concordant distribution of fosfomycin MICs against non-CF *P. aeruginosa* with both agar dilution and broth microdilution methods indicates that the latter is a reliable procedure that might validate those results obtained with routinely used, automated broth microdilution-based systems. The validation of an alternative inoculum (10^6 CFU/ml) may allow for the more confident results when using diffusion methods. FT combination merits consideration as a treatment strategy against *P. aeruginosa* infections due to the potential synergy and the prevention of resistance development when the two antimicrobials are administered together. This combination may be particularly beneficial in those infections that develop in anaerobic environments, such as biofilm-mediated ones.



Introducción

INTRODUCCIÓN

1-Fosfomicina

La fosfomicina (ácido 1,2-epóxipropilfosfónico) es un antibiótico natural descubierto por un grupo español en 1969. Su hallazgo tuvo lugar como resultado de un programa de investigación de nuevos antibióticos llevado a cabo por la compañía Merck y la Compañía Española de Penicilina y Antibióticos (CEPA). La fosfomicina, como se denominó en un primer momento, se aisló a partir de *Streptomyces fradiae* procedente de una muestra de tierra de la provincia de Alicante (1).

Actualmente su producción es sintética. Su estructura química es muy sencilla y no está relacionada con ninguna otra familia de antibióticos. Posee un peso molecular muy bajo (138,1) y es altamente hidrosoluble. Combina un anillo epóxido y tres átomos de carbono con un enlace carbono-fosfórico sin puente de oxígeno intermedio (**Figura 1**). La actividad antibacteriana se debe al enlace epoxi.

Se formula como sal disódica para su administración por vía parenteral y como sal cálcica o con la incorporación de la base orgánica tris-hidroximetil-aminoetano (trometamol o trometamina) que es una sal monobásica hidrosoluble, para su administración por vía oral en infecciones del tracto urinario (**Figura 1**).

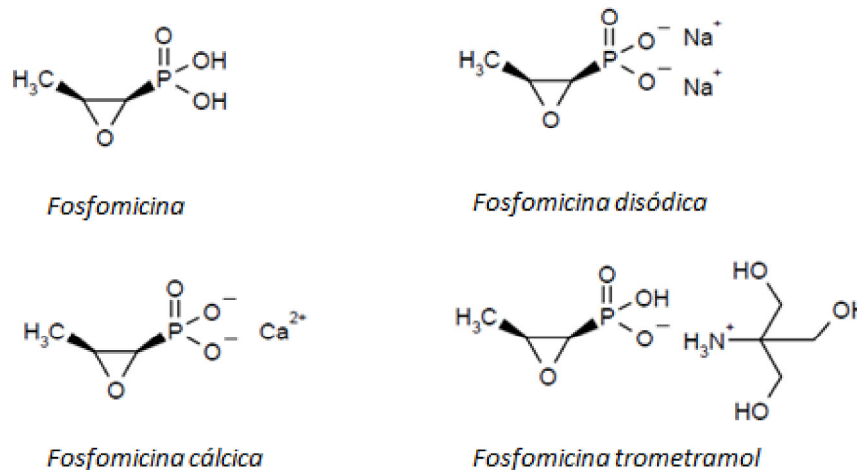


Figura 1: Estructura química de fosfomicina y de sus formulaciones para la administración por vía intravenosa (fosfomicina disódica) y por vía oral (fosfomicina cálcica y fosfomicina trometamol)

Este antibiótico se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de infecciones urinarias por vía oral, mientras que su uso por vía intravenosa ha estado limitado a determinados países como España, Francia o Japón. Debido a su amplio espectro de acción, el interés por este compuesto se ha incrementado en los últimos años por el aumento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes con escasas opciones terapéuticas, frente a las cuales fosfomicina parece mantener su actividad. El aumento de esta resistencia no ha venido acompañada del desarrollo paralelo de nuevos antimicrobianos. En este contexto, el uso de fosfomicina se ha revalorizado presentándose como una alternativa de tratamiento frente a patógenos multirresistentes.

1.1-Mecanismo de acción

La fosfomicina actúa en el citosol de la célula bacteriana bloqueando el primer paso de la síntesis del peptidoglucano. Para ello, inhibe la enzima UDP-N-acetilglucosamina-enolpiruvil transferasa (MurA). Esta enzima cataliza la formación de N-acilmuránico (precursor del peptidoglucano) a través de la unión de N-acetilglucosamina y fosfoenolpiruvato. Fosfomicina es un análogo del fosfoenolpiruvato que se une covalentemente a la enzima bloqueando su acción (**Figura 2**).

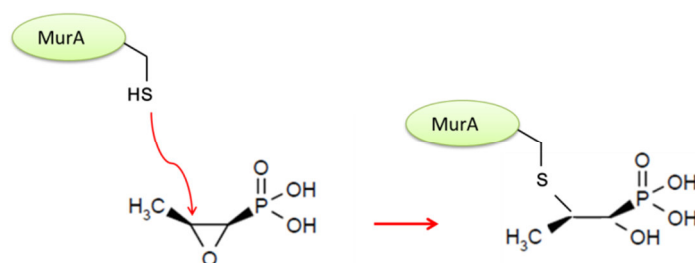


Figura 2: Mecanismo de acción de la fosfomicina. Inhibición de la enzima UDP-N-acetilglucosamina-enolpiruvil transferasa (MurA) bloqueando la síntesis del peptidoglucano.

1.2-Característica farmacocinéticas-farmacodinámicas

Debido a su bajo peso molecular, su larga vida media (2.4-7.3 horas) y su baja unión a proteínas plasmáticas, fosfomicina difunde fácilmente en la mayoría de tejidos y en el líquido intersticial.

De hecho, se ha demostrado que penetra y alcanza concentraciones relevantes en tejidos inflamados, humor acuoso y vítreo, hueso y pulmón. El grado de penetración en tejidos parece ser mayor en tejido subcutáneo y músculo, seguido de pulmón y hueso (2). Aunque la fosfomicina atraviesa la barrera hematoencefálica en pacientes con meningitis, su actividad puede verse reducida en líquido cefalorraquídeo (3). Así mismo, penetra activamente en el interior de los leucocitos polimorfonucleares.

La **fosfomicina cálcica** tiene una tasa de absorción de entre el 20-40% y llega a una concentración máxima de entre 3-9.4 mg/l dependiendo de la dosis administrada (0.5-1 gramo cada 6 horas). Un tercio se elimina por orina y otro tercio se elimina por heces. El resto se elimina más lentamente durante 6-7 días.

La **fosfomicina trometamol** tiene una tasa de absorción de entre el 37-50%. La concentración máxima alcanzada es de 22-32 mg/l a las dos horas después de una administración de 3 gramos de fosfomicina (contenidos en 5.63 gramos de fosfomicina trometamol). En orina se llegan a alcanzar concentraciones muy altas después de 3 horas post administración (1053–4415 mg/l) que se mantienen durante varios días (4).

La **fosfomicina disódica** se administra por vía intravenosa, y en raras ocasiones intramuscularmente. Por vía intramuscular las concentraciones plasmáticas máximas están entre 17-45.5 mg/l, dependiendo de la dosis (0.5-2 gramos).

Por vía intravenosa la dosis diaria varía entre 12-16 gramos administrada en 2-4 infusiones. Cuando se prescriben más de 16 gramos por día existe riesgo de hipocalcemia por el exceso de sodio administrado. Después de una administración intravenosa de fosfomicina disódica la concentración alcanzada está dentro del rango de 75 a 644 mg/l (2).

La eliminación sucede casi exclusivamente vía renal por filtración glomerular.

A pesar de que fosfomicina se utiliza en la clínica desde hace más de 40 años, aún no está claramente definido el índice farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) que determina su eficacia: AUC/CMI, C_{max}/MIC o %T>CMI. Parece tener un comportamiento concentración dependiente y con efecto post-antibiótico prolongado para algunos microorganismos como *Escherichia coli* y *Proteus spp.*, mientras que para *Staphylococcus aureus* presenta un comportamiento tiempo dependiente.

En un trabajo publicado recientemente en el que se estudia qué índice farmacodinámico está relacionado con la mayor eficacia antimicrobiana, se demuestra que en *E. coli* cuando se utiliza la CMI modal, el índice de eficacia que mejor se ajusta es el AUC/CMI.

Sin embargo cuando se utiliza la CMI de la subpoblación resistente (CIR), el mejor parámetro - que describe la eficacia de fosfomicina es el T>CIR% (5).

En un modelo farmacodinámico de fibra hueca en *E. coli* productor de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), se estableció que el índice PK/PD que mejor está relacionado con la supresión de la aparición de resistencias es AUC/Cmax. (6)

1.3-Uso clínico de fosfomicina

1.3.1-Uso de fosfomicina para tratamiento de infección urinaria

Fosfomicina se ha usado ampliamente para el tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITU), sobre todo para aquellas causadas por *E. coli* y *Enterococcus faecium*. En Estados Unidos únicamente está aprobado su uso por vía oral para el tratamiento de las ITUs no complicadas en mujeres. Su administración en una sola dosis alcanza una concentración urinaria alta y mantenida, lo que hace de este compuesto una buena opción terapéutica para el tratamiento de estas infecciones.

La fosfomicina también se ha empleado para tratamiento de infecciones urinarias complicadas causadas por enterobacterias productoras de BLEE con tasas de curación clínica de más del 90% (7), patógenos multirresistentes como *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas con éxito terapéutico del 46%, 38% para *Pseudomonas aeruginosa* y 71% en enterococo resistente a vancomicina. Se observaron mayores tasas de fracaso terapéutico debido a la aparición de resistencias en *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas en pacientes con trasplante de órgano sólido y con *stent* ureteral (8).

Así mismo se ha utilizado para el tratamiento de prostatitis por vía oral e intravenosa, ya que alcanza una buena concentración en tejido prostático. No obstante, los datos clínicos son escasos y los regímenes de dosificación inciertos (9,10).

1.3.2-Uso de fosfomicina para infecciones no urinarias

Según sus propiedades farmacocinéticas, espectro de acción y vías de administración, la fosfomicina se puede emplear y se ha utilizado con éxito en el tratamiento de meningitis, endocarditis, infección ocular, infección post-quirúrgica, encefalitis, infección de *shunt*, bacteriemia, enteritis, glomerulonefritis, prostatitis, infección respiratoria y en infecciones ginecológicas. Los microorganismos más frecuentemente tratados son *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *E.coli*, y *Proteus* spp.(11)

Se ha utilizado en pacientes críticos con sepsis o infección nosocomial debido a *S. aureus* resistente a metilicina (SARM), *Enterococcus* resistentes a vancomicina, y bacilos Gram

negativos multirresistentes, como *K. pneumoniae*, y *P. aeruginosa*, en combinación con otros antibióticos para evitar la selección de mutantes resistentes.

Así mismo, se ha empleado para la prevención de infecciones postoperatorias en pacientes con cirugía urológica, y en profilaxis perioperatoria en cirugía colorrectal, asociada a metronidazol.

Actualmente su uso para tratamiento de sepsis e infección de tejidos blandos está aprobado en varios países europeos. Sin embargo, la formulación intravenosa solo está disponible en España, Francia, Alemania, Austria, Grecia y Japón.

En una revisión en la que se recogen 31 casos de distintos tipos de infecciones (neumonía, osteomielitis, meningitis, infección ótica, artritis, septicemia, peritonitis, linfadenitis, infección ocular, infección de pie diabético y fiebre tifoidea) causadas principalmente por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Proteus*, y *Salmonella Typhi* tratadas con fosfomicina, sola o en combinación con β -lactámicos, clindamicina, gentamicina o ciprofloxacino, la tasa global de curación fue del 81.2%, mientras que en el 2.9% la mejoría fue notable (11).

En otra revisión en la que se analizan 6 estudios con un total de 33 pacientes (31 con fibrosis quística) con exacerbación pulmonar por *P. aeruginosa* multirresistente tratados con fosfomicina (25 en combinación y 8 en monoterapia), hubo un éxito terapéutico en el 90.9% (9).

1.3.3-Uso de fosfomicina vía inhalada

Los antibióticos inhalados se utilizan como tratamiento principal de la infección pulmonar crónica causada por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística. En un estudio multicéntrico aleatorizado doble ciego publicado en 2012, se comparó el tratamiento inhalado en ciclos *on-off* con aztreonam y placebo, y la terapia con rotación de aztreonam y la combinación fosfomicina-tobramicina en dos regímenes distintos de dosificación (80/20 mg y 160/40 mg). Se observó una mejoría estadísticamente significativa en el porcentaje de FEV1 en los pacientes que recibían la rotación con fosfomicina-tobramicina a 80/20 mg versus placebo. Así mismo, se observó menor recuento (UFC/ml) de *P. aeruginosa* por gramo de esputo y una mejoría en los síntomas respiratorios (12).

La acción de la asociación fosfomicina-tobramicina en ratio de concentración 4:1 se ha estudiado sobre *biofilm* de *P. aeruginosa* crecido sobre células epiteliales de vía respiratoria de pacientes con fibrosis quística. Las UFC (unidades formadoras de colonia) (por pocillo) se redujeron en 4 log₁₀ con la combinación y con la tobramicina, mientras que la fosfomicina sola

no tuvo efecto sobre el biofilm. La asociación fue ventajosa sobre la tobramicina en términos de reducción de cantidad de aminoglucósido necesario para lograr la destrucción del biofilm, ya que se necesitó 5 veces menos concentración (51,2 mg/l versus 256 mg/l). Así mismo, también se necesitó menos concentración de tobramicina cuando estaba combinada para inhibir la formación de biofilm (13).

1.4-Efecto inmunomodulador

Una de las características que fosfomicina ha demostrado tener más allá de su efecto antimicrobiano es su efecto inmunomodulador (**Figura 3**). El efecto inmunomodulador global se ha demostrado tanto para la fosfomicina como para su enantiómero sin actividad antimicrobiana (14). Mediante esta actividad, fosfomicina inhibe la respuesta proliferativa y la capacidad de diferenciación de los **linfocitos B**. Esto sería ventajoso considerando que la activación policlonal de estas células como respuesta frente a microorganismos participa en procesos como la inflamación crónica. (15) Los mismos autores demostraron también que la fosfomicina disminuye la producción de IL-2 por parte de los **linfocitos T** estimulados con lipopolisacárido (LPS), lo que prevendría su expansión clonal (16). También disminuye la producción de IL-8 por parte de los **monocitos** y de leucotrienos por parte de los **neutrófilos** encargados de promover la inflamación y la quimiotaxis (17). Fosfomicina también modula la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α y IL-1 β (18).

A diferencia de otros antibióticos como tobramicina o tetraciclina que alteran la capacidad destructiva o fagocítica de los **neutrófilos**, fosfomicina ha demostrado potenciar su actividad bactericida al incrementar la concentración de calcio intracelular y aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (19).

También es capaz de suprimir la liberación de histamina mediada por IgE por parte de los basófilos, con la consiguiente acción antialérgica (20).

La actividad antimicrobiana de la fosfomicina junto con los mencionados efectos inmunomoduladores hacen que la fosfomicina sea clínicamente útil para el tratamiento de pacientes con sepsis o con fibrosis quística.

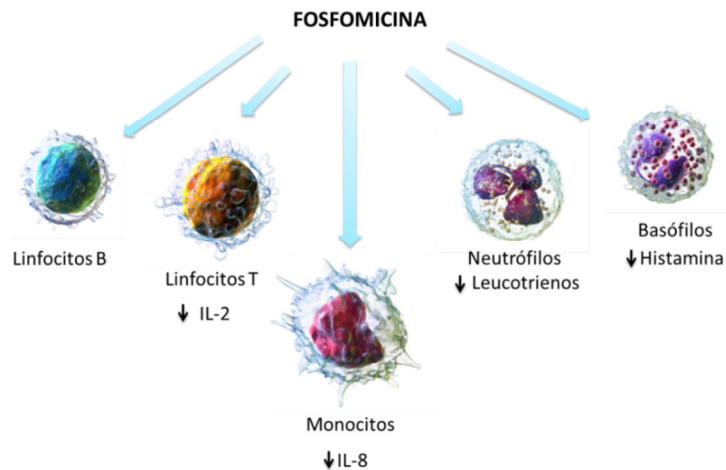


Figura 3: Efectos de fosfomicina sobre el sistema inmunológico. Adaptado de Blausen.com "Blausen gallery 2014"

1.5-Mecanismos de Resistencia

Existen diversos mecanismos por los que las bacterias pueden ser resistentes a fosfomicina: 1) modificación de la diana, 2) inactivación del antibiótico o 3) por reducción de la permeabilidad, siendo este último el mecanismo más comúnmente encontrado en los aislados clínicos.

1.5.1-Modificación de la diana MurA

Como se mencionó anteriormente, fosfomicina se une covalentemente a la enzima MurA inactivándola irreversiblemente. Las mutaciones en el sitio de unión (Cys115) y el incremento en la producción de MurA pueden originar resistencia en *E. coli* (21). Bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* y *Borrelia burgdorferi* poseen un residuo Asp en esta posición, lo que hace que sean intrínsecamente resistentes (22–24). Sin embargo, la generación de resistencias a partir de modificaciones en MurA parece ser muy excepcional en aislados clínicos, ya que los cambios en la secuencia de MurA que reducen la afinidad por fosfomicina, también afectan a la biosíntesis de peptidoglucano (25).

1.5.2-Modificación e inactivación antibiótica

Las principales enzimas capaces de modificar e inactivar la fosfomicina son: FosA, FosB, y FosX. Todas ellas catalizan la apertura del anillo oxirano utilizando distintos sustratos que se unen al antibiótico. Pertenecen a la misma superfamilia de metaloenzimas dependientes de ión divalente (**Figura 4**).

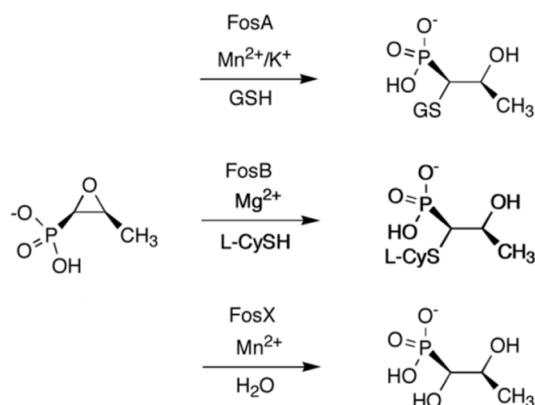


Figura 4: Mecanismo de acción de las distintas enzimas que catalizan la apertura del anillo epóxido de la fosfomicina.

FosA: fue la primera enzima descubierta capaz de modificar e inactivar la fosfomicina. Es una glutatión S-transferasa dependiente de Mn^{2+} que cataliza la adición de glutatión al anillo oxirano inactivando la molécula. También requiere K^+ que interacciona con el sitio activo para una actividad óptima. Está codificada en un plásmido localizado en un transposón (Tn2921) en aislados clínicos de enterobacterias (26), mientras que no se han encontrado resistencias transferibles en *P. aeruginosa* (27). Ésta sin embargo, posee una variante de FosA en su cromosoma (PA1129) cuya homología en la secuencia aminoacídica es del 60%. Aunque FosA-Tn 2921 presenta una actividad catalítica muy alta, la actividad de PA1129 es débil. Se han demostrado diferencias en la estructura tridimensional de ambas proteínas, concretamente en los bucles que se unen al K^+ , que podrían relacionarse con las diferencias catalíticas (28). La implicación de PA1129 en la resistencia a fosfomicina de aislados clínicos de *P. aeruginosa* no ha sido por el momento estudiada.

FosB: es una enzima tiol-S-transferasa relacionada con FosA, que fue por primera vez descubierta en *Staphylococcus epidermidis*. Desde entonces se ha detectado en plásmidos y en cromosomas de varias bacterias grampositivas, incluyendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecium*. Esta enzima cataliza la adición de un grupo tiol, usando la L-cisteína como donador y Mg^{2+} , Ni^{2+} o Mn^{2+} como cofactores. A diferencia de FosA, no es dependiente de catión monovalente.

FosX: FosX es una subfamilia de enzimas que guardan una homología en la secuencia genómica con FosA y FosB del 30%, aproximadamente. Análogos de esta enzima se encuentran en el cromosoma de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Brucella melitensis*. Es una

hidrolasa dependiente de Mn^{2+} que cataliza la incorporación de agua a la posición C1 del antibiótico, rompiendo así el anillo oxirano.

1.5.3-Reducción de la permeabilidad

El fallo en el transporte de fosfomicina al interior celular es el principal mecanismo de resistencia a fosfomicina encontrado en aislados clínicos. Esto es debido a mutaciones en los genes que codifican las permeasas encargadas del transporte. En *E. coli* coexisten el transportador del glicerol 3-fosfato (GlpT) y el transportador de la glucosa 6-fosfato (UhpT), a través de los cuales fosfomicina accede al interior celular. La expresión de estos transportadores está inducida por sus respectivos sustratos, glicerol 3-P y glucosa 6-P, respectivamente y requiere la presencia de cAMP-CRP.

A diferencia de *E. coli*, *P. aeruginosa* carece del transportador glucosa 6-fosfato (UhpT) y el acceso de fosfomicina únicamente sucede a través de la permeasa del glicerol 3-fosfato (GlpT) (29). Las bacterias deficientes en el transporte de fosfomicina, son incapaces de crecer en medios con esos sustratos como única fuente de carbono. Por ejemplo, cepas deficientes en GlpT son incapaces de crecer en medio con glicerol 3-fosfato como única fuente de carbono (30).

Transportador de la glucosa 6-P (UhpT)

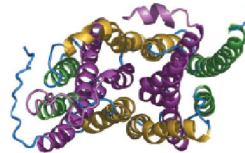
UhpT es un transportador dentro de la superfamilia principal de transportadores facilitadores (MFS), que intercambia una molécula de fosfato citoplasmático por una hexosa-fosfato. UhpT es un monómero con 12 segmentos α -hélice transmembrana, controlado por un sistema regulador formado por *uhpA*, *uhpB* y *uhpC* cuyos productos son necesarios para la expresión de UhpT. Algunas mutaciones en este sistema regulador, también generan resistencia a fosfomicina.

Transportador del glicerol 3-fosfato (GlpT). Resistencia a fosfomicina en *P. aeruginosa*.

GlpT es un sistema transportador “antiporte” que también pertenece a la superfamilia principal de transportadores facilitadores (MFS). Está compuesto por doce segmentos α hélice transmembrana (H1-H12) con bucles que conectan las hélices y con los extremos N- y C-terminal localizados en el citoplasma. **H3, H6, H9 y H12** son hélices periféricas no implicadas en la formación del poro, mientras que **H2, H5, H8 y H11** son hélices periféricas que delimitan el poro central, y finalmente **H1, H4, H7, H10** son las hélices centrales. En el poro citoplasmático hay una fuerte carga positiva atribuida a dos restos de arginina en H1 y en H7 (**Figura 5**). A través de esta permeasa se transporta una molécula de fosfato inorgánico hacia el exterior de

la célula a favor de gradiente, lo que hace que se pueda transportar una molécula de glicerol 3-fosfato al interior celular en contra de gradiente.

A



B -

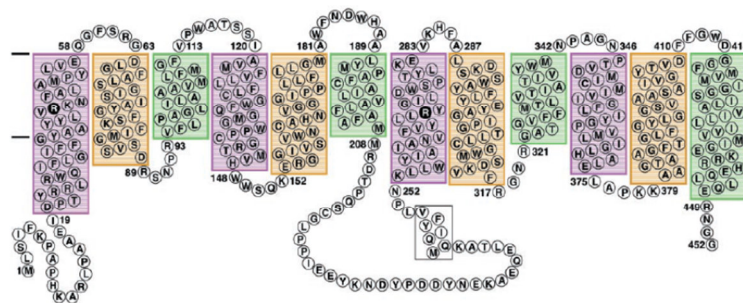


Figura 5: Estructura del transportador GlpT. **A-** Representación tridimensional de la estructura del GlpT vista desde el citosol. **B-** Representación de las hélices y su secuencia aminoacídica. Las hélices periféricas están representadas en verde (H3, H6, H9, H12). Las hélices periféricas implicadas en la formación del poro están representadas en amarillo (H2, H5, H8, H11). Las hélices centrales están representadas en morado (H1, H4, H7, H10).

Este transportador posee dos formas conformacionales, una hacia el exterior, en el periplasma y otra hacia el interior, en el citoplasma celular.

El ión fosfato del citoplasma celular se uniría al transportador en los restos de arginina. Los doce segmentos transmembrana forman dos dominios de seis hélices que se acercarían y crearían un nuevo poro hacia el exterior periplásmico. La presencia de glicerol 3-P en el periplasma, que tiene gran afinidad por GlpT, desplazaría al P_i hacia el exterior cambiando la conformación y liberando el glicerol 3-P en el interior celular (**Figura 6**)(31).

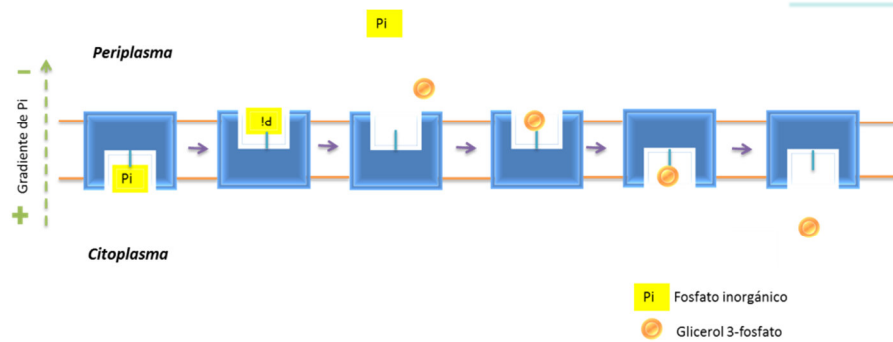


Figura 6: Secuencia de funcionamiento del transportador GlpT. Salida de Pi al exterior celular y entrada de una molécula de glicerol-P

La homología estructural de la fosfomicina con el glicerol 3-fosfato (**Figura 7**), hace posible que pueda usar este transportador para pasar al interior celular y por tanto, las mutaciones que se traduzcan en cambios en la proteína GlpT en *P. aeruginosa* son responsables de la resistencia a fosfomicina. Una alta concentración de ión fosfato en el exterior celular también inhibiría el transporte del glicerol 3-P, así como el transporte de la fosfomicina al interior celular.

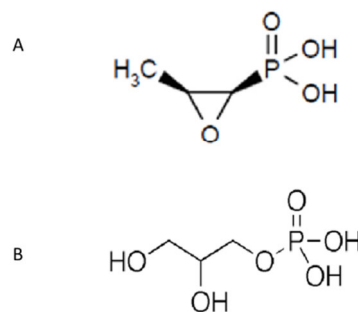


Figura 7: Homología estructural entre la fosfomicina (A) y el glicerol 3-P (B)

La expresión de GlpT se induce con la presencia de glicerol 3-fosfato. El represor GlpR bloquea la transcripción del gen *glpT* uniéndose a los operadores cercanos al promotor. La interacción del glicerol 3-P con GlpR reduce la afinidad por el operador y activa la síntesis de GlpT. La inactivación de GlpR conlleva la expresión constitutiva de *glpT* (25)(**Figura 8**).

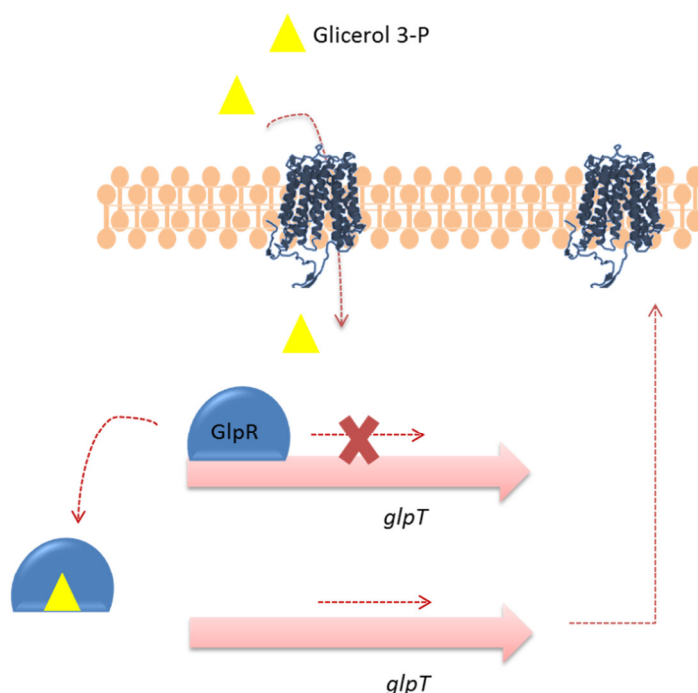


Figura 8: Figura que representa la regulación en la expresión del GlpT. La presencia de glicerol 3-P hace que se bloquee el represor GlpR, permitiendo la expresión del gen *glpT*, con el consiguiente aumento de transportadores en la célula.

Para que se genere resistencia a fosfomicina en *E. coli*, se tienen que afectar los dos transportadores, UhpT y GlpT. En este caso, la adquisición de resistencia conlleva un coste biológico asociado debido a que *E. coli* utiliza principalmente azúcares para la obtención de energía y como fuente de carbono para la glucólisis. Sin embargo, la resistencia a fosfomicina en *P. aeruginosa* se produce cuando se afecta el transportador GlpT y no conlleva un coste biológico asociado (32). Debido a su versatilidad metabólica, *P. aeruginosa* puede utilizar un amplio número de compuestos que suplementarían la falta de glicerol 3-fosfato.

Así mismo, en *E. coli* los genes *glpT* y *uhpT* están regulados positivamente por los niveles de AMP cíclico en la célula, por lo tanto mutaciones que disminuyan estos niveles van a provocar resistencias a fosfomicina. Sin embargo, la reducción del AMP cíclico conlleva importantes consecuencias en el metabolismo de la bacteria, lo que explica el coste biológico de esta resistencia. En *P. aeruginosa* sin embargo, el gen *glpT*, no está regulado por el AMP cíclico, por tanto la resistencia a fosfomicina no está asociada a una disminución de la virulencia. Esto hace que la frecuencia de mutación a este antibiótico en la población salvaje de esta especie sea alta (10^{-6}).

1.6-Determinación de la sensibilidad *in vitro* a fosfomicina

Cuando se determina la sensibilidad *in vitro* a un antimicrobiano se pretende que los resultados obtenidos se puedan extrapolar y se asemejen lo máximo posible a lo que sucede tras la administración del fármaco *in vivo*. Esto es en general difícil de conseguir, ya que existen múltiples factores que pueden influir en la actividad antibiótica tras su administración. Con el objetivo de conseguir la mayor aproximación posible, se deben establecer unas condiciones de ensayo óptimas. A la hora de determinar la sensibilidad a fosfomicina hay que tener en cuenta diversos factores como son: el tipo de medio de cultivo, la cantidad de inóculo, el tipo de atmósfera (aerobiosis o anaerobiosis) y el pH, ya que su variación puede influir en el resultado final.

1.6.1- Características del medio de cultivo

Adición de sustancias inductoras

Como se comentó en el punto anterior, en varias especies bacterianas (*Staphylococcus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* y *Shigella*), fosfomicina puede acceder al interior celular a través de dos transportadores de azúcares: GlpT y UhpT. El hecho de que ambos sean inducibles por sus respectivos sustratos, condiciona las características del medio de cultivo a utilizar.

Fosfomicina utiliza el transportador del glicerol 3-P como principal mecanismo de entrada al interior celular en especies bacterianas UhpT(-) o especies UhpT(+) sin inducir. Los inductores de GlpT son tanto el glicerol como el glicerol 3-P, aunque parece haber una mayor inducción con el glicerol (33,34). GlpT también posee una actividad basal sin inductores. Sin embargo, una alta concentración de ion fosfato en el exterior celular inhibe el transporte del glicerol 3-P y así mismo, también antagoniza la actividad de fosfomicina impidiendo su entrada al interior celular.

La adición de glucosa 6-P al medio potencia la actividad de fosfomicina en aquellos microorganismos que poseen este transportador. De hecho, este efecto se observó en los primeros trabajos con fosfomicina, en los que se demostró un aumento considerable de actividad antibiótica si el medio de cultivo estaba suplementado con sangre (35). Posteriormente, se descubrió que la sustancia potenciadora presente en la sangre era una mezcla de glucosa 1-P, fructosa 6-P y glucosa 6-P, siendo esta última la principal sustancia implicada (36).

Mientras que GlpT mantiene una actividad basal sin ser inducido, UhpT carece de actividad en ausencia de la glucosa 6-P. Al contrario, concentraciones muy elevadas de glucosa

6-P (>300 μ M) antagonizan la acción de fosfomicina debido a la competición de ambas sustancias por el sitio activo.

En un estudio publicado por Dette *et al.* en 1983 se determinó el efecto que tenía la adición de glucosa 6-P al medio Muller-Hinton (37). Se observó que en el medio suplementado, la CMI disminuía de 4 a 5 diluciones con respecto al no suplementado en *E. coli*, *S. aureus*, y *Enterobacter cloacae*, pero no en *P. aeruginosa* ni en *P. mirabilis*. La máxima inducción observada *in vitro*, sucedió con una concentración de 25 mg/l, que es la actualmente estipulada a añadir cuando se determina la sensibilidad a fosfomicina.

Así mismo, en este mismo estudio, se determinó la actividad de fosfomicina en homogenizado de tejido y se comparó con aquella obtenida en medio Muller-Hinton líquido suplementado con glucosa 6-P. La concentración de glucosa 6-P en tejidos varía aproximadamente desde 20 μ g/g en cerebro, 12 μ g/g en pulmón y riñones, 57 μ g/g en hígado, hasta 95 μ g/g en corazón. Sin embargo, no se ha detectado glucosa 6-P en sangre, debido su rápida degradación por hidrólisis estérica. Se obtuvieron los mismos resultados de sensibilidad para *E. coli*, *S. aureus*, *E. cloacae* y *P. aeruginosa*. Sin embargo, la actividad de fosfomicina en *P. mirabilis* fue mayor en tejidos que en el Muller-Hinton. (37)

Estos datos ya indicaban que tanto *P. aeruginosa* como *P. mirabilis* carecen de transportador para la glucosa 6-P y que por tanto, su adición al medio cuando se determina la actividad de fosfomicina frente a estos microorganismos no es necesaria.

Por tanto, en enterobacterias (excluyendo *P. mirabilis*) y en *Staphylococcus* spp. en las que coexisten los dos transportadores (UhpT y GlpT), fosfomicina podría entrar al interior celular por ambos. GlpT sería el principal mecanismo por el cual fosfomicina entra al interior celular en ausencia de la inducción por glucosa 6-P, mientras que UhpT suplantaría a GlpT cuando está inducido por la glucosa 6-P. El hecho de que este sistema UhpT sea inducible, hace necesaria la suplementación del medio con glucosa 6-P cuando se determine la sensibilidad *in vitro* a fosfomicina en estas especies bacterianas (38,39).

En la **Figura 9** se puede observar el funcionamiento de ambos transportadores y su actividad tras la adición al medio de sus respectivos inductores. En la cepa GlpT(-) UhpT(+) la acumulación de fosfomicina en el interior celular es nula, ya que al no haber inducción por glucosa 6-P, este transportador no es efectivo.

Cuando se añade **glicerol al medio** (10mM), la concentración de fosfomicina intracelular en la cepa salvaje [GlpT(+) UhpT(+)] aumenta ligeramente, por la inducción del transportador GlpT. La cepa [GlpT(-) UhpT(+)] sin embargo no se ve afectada.

Tras la inducción con glucosa 6-P, ambas cepas aumentan la concentración intracelular de fosfomicina hasta 5 veces al ser UhpT(+). Y este transportador suplantaría al GlpT en la cepa salvaje [GlpT(+) UhpT(+)].

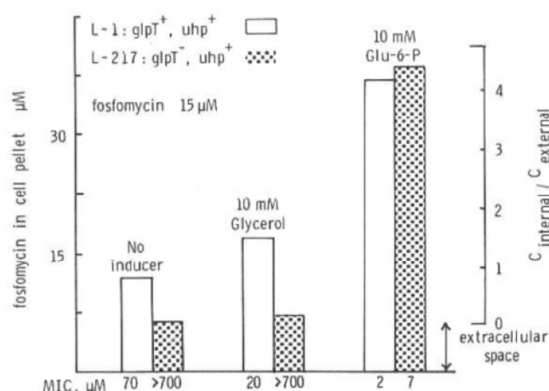


Figura 9: Actividad basal del transportador GlpT y UhpT y tras la adición al medio de sus respectivos inductores en cepas GlpT⁺ UhpT⁺, y GlpT⁻ UhpT⁺ (36).

Tipo de medio de cultivo, pH y atmósfera.

La actividad de fosfomicina se ha determinado en diversos **medios de cultivo**, como medio nutritivo, Muller-Hinton, Iso-Sensitest, y Eugonbroth. La actividad es antagonizada en medios con altas concentraciones de glucosa, fosfatos y cloruro de sodio (40). En el desarrollo inicial de este compuesto, se recomendó el uso de medio líquido o agar nutritivo para la determinación de sensibilidad, ya que la actividad de fosfomicina se veía negativamente afectada con el uso de Muller-Hinton (35,41). Sin embargo posteriormente se eligió este medio para la estandarización de los métodos de determinación de sensibilidad (42). La actividad de fosfomicina también está favorecida en medio Eugonbroth (40).

Se ha demostrado que a medida que disminuye el **pH**, la actividad antibiótica de fosfomicina aumenta, alcanzando su máxima actividad a un pH de 5.5. Esto tiene relevancia si tenemos en cuenta el tipo de infección; en infecciones que cursan a pH bajos como la infección urinaria, la actividad de fosfomicina se incrementa. De hecho, la frecuencia de desarrollo de mutantes resistentes también disminuye a pH bajos.

Una **atmósfera anaerobia** favorece la actividad de fosfomicina, aunque con inóculos altos (10⁸UFC/ml) esta potenciación no se observa (43,44). También se ha demostrado que la asociación de fosfomicina-tobramicina aumenta su actividad frente a *P. aeruginosa* en

condiciones anaeróbicas, debido a una disminución de la expresión de los genes que codifican para la enzima nitrato reductasa, esencial para el crecimiento en esta atmósfera (45).

Inóculo

La **cantidad de inóculo** utilizada influye en el resultado de sensibilidad, observándose mayores CMI's con inóculos altos. La influencia del inóculo demostró ser mayor en medios nutritivos que en peptona, y a su vez mayor en medio líquido que en agar (46). La presencia de orina en el medio y un inóculo de 10^8 UFC/ml disminuyen la actividad antibacteriana, resultando en un aumento de 2-8 veces en el valor de CMI (40).

2-Pseudomonas aeruginosa

2.1- Características generales

Pseudomonas aeruginosa proviene del griego **pseudes**, “falso”; **monas**, “una unidad”; por la gran diversidad entre las especies que engloba el género y **aeruginous**, que significa “el color del cobre oxidado”, refiriéndose al pigmento verde sintetizado por esta especie.

P. aeruginosa es un bacilo gramnegativo móvil, no fermentadores que utilizan los hidratos de carbono a través del metabolismo respiratorio con el oxígeno como aceptor final de electrones. Si bien se lo considera aerobio estricto, puede crecer en condiciones anaerobias utilizando el nitrato o la arginina como aceptor terminal de electrones. Es oxidasa y catalasa positivo.

P. aeruginosa es un microorganismo muy ubicuo debido a las sencillas necesidades de crecimiento y la versatilidad nutricional. Es capaz de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de nitrógeno y puede crecer a temperaturas superiores a 42°C. Posee muchos factores estructurales, enzimas y toxinas que aumentan su virulencia, y es intrínsecamente resistente a numerosos antibióticos. Se puede encontrar en diversos tipos de ambientes, tanto acuáticos y terrestres, tejidos de animales, y en la vegetación. Así mismo, forma parte del ambiente hospitalario, siendo aislada de soluciones acuosas incluyendo desinfectantes, jabones, fluidos de irrigación y de diálisis y diferentes equipamientos (47).

Es infrecuente que forme parte de forma persistente de la flora microbiana normal del ser humano, excepto en los pacientes hospitalizados y en pacientes inmunodeprimidos donde además puede actuar como patógeno oportunista.

2.2- Importancia clínica de *P. aeruginosa*

Excepcionalmente es causante de infecciones en la comunidad en pacientes sanos, describiéndose infecciones cutáneas como foliculitis asociada a exposición a fuentes de agua caliente, artritis séptica en usuarios de drogas parenterales, otitis externa e infección ocular.

Las infecciones invasivas por *P. aeruginosa* generalmente se producen en pacientes con patologías de base como inmunodeficiencias, quemaduras o fibrosis quística. Principalmente es causante de infecciones intrahospitalarias, cobrando especial relevancia en UCI y en unidades de críticos oncohematológicos. Los largos periodos de estancia hospitalaria, la gravedad de los pacientes y la exposición a procedimientos invasivos, así como los factores de virulencia y la alta resistencia a antibióticos de este microorganismo están asociados a la adquisición de infecciones por *P. aeruginosa* (48). En la **Tabla 1** se resumen las principales infecciones causadas por *P. aeruginosa* y los factores de riesgo relacionados.

Infección	Factores de riesgo
Tejidos blandos	Quemaduras, heridas abiertas, herida quirúrgica
Tracto urinario	Uso de catéter urinario
Bacteriemia	Inmunosupresión
Pie diabético	Diabetes, circulación microvascular deteriorada
Neumonía	Edad avanzada, EPOC, FQ, ventilación mecánica
Otitis externa/media	Daño en tejido, acumulación de agua
Queratitis	Usuarios de lentes de contacto

Tabla 1: Principales infecciones causadas por *P. aeruginosa* y factores de riesgo relacionados. EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), FQ (fibrosis quística) (49).

La tasa de colonización hospitalaria puede llegar hasta el 50%. Es causante del 20-30% de las neumonías asociadas a ventilación mecánica (50), 10-20% de infecciones del tracto urinario y del 3-10% de bacteriemias (51).

Las **infecciones respiratorias** causadas por *P. aeruginosa* pueden ser tanto agudas como crónicas. Dentro de las infecciones **agudas**, es uno de los principales responsables de la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) tardía. La presencia de lesiones secundarias a la intubación traqueal, ventilación mecánica, o traumatismos por la aspiración de secreciones, junto a la posibilidad de *P. aeruginosa* de crecer en forma de biofilm en la superficie del tubo endotraqueal, van a ser los factores principales que favorecerán la colonización y la posterior infección. Las NAV por *P. aeruginosa* pueden llegar a tener una tasa de mortalidad de hasta el 50 % entre los pacientes afectados (52).

Si no se erradica durante la fase de infección aguda, puede adaptarse al ambiente pulmonar causando **infección crónica**, como es el caso de los pacientes con fibrosis quística donde infecta hasta más de un 90% de los pacientes adultos, elevando la mortalidad y el deterioro pulmonar (53). También es habitual en pacientes con EPOC donde presenta un patrón de infección semejante al observado en fibrosis quística. La cronicidad en este tipo de infecciones se debe a la adaptación de *P. aeruginosa* a las vías respiratorias con la formación de *biofilm*, a la cápsula polisacáridica de alginato que determina el morfotipo mucoso y a la pérdida de genes de virulencia (49).

P. aeruginosa es el segundo microorganismo gramnegativo causante de **bacteriemias** en UCI (54) con una alta tasa de mortalidad (17-50%)(55). Los factores asociados a esta elevada mortalidad son la neutropenia, la presencia de shock séptico, la terapia antibiótica inadecuada y el origen pulmonar de la bacteriemia (56).

Respecto a la **infección urinaria**, la cateterización favorece el ingreso de *P. aeruginosa* en las vías urinarias. La infección ocurre por la colonización de la orina dentro del lumen del catéter y en el espacio entre la uretra y la superficie del catéter. En un estudio llevado a cabo en Estados Unidos se observó que *P. aeruginosa* es el segundo patógeno más común causante de infección del tracto urinario (11.3%). Según el estudio SMART que tuvo lugar en la región Asiática del Pacífico, *P. aeruginosa* fue el causante del 7.2% de las infecciones del tracto urinario superior (57).

2.3-Factores de virulencia

Los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de infecciones agudas presentan numerosos factores de virulencia (**Figura 10**), al contrario de los procedentes de infecciones crónicas, que frecuentemente han perdido capacidad inflamatoria debida a la falta de flagelos, pili, y sistema de secreción tipo 3.

P. aeruginosa posee un **flagelo polar** y numerosos **pilis tipo 4** localizados en el polo de la célula que permiten la adhesión y motilidad. Así mismo, estos elementos son los responsables del inicio de la respuesta inflamatoria.

El **sistema de secreción tipo III** es un determinante principal de virulencia y su expresión se ha relacionado con infecciones invasivas agudas y con un incremento de mortalidad. A través de este sistema la bacteria es capaz de inyectar proteínas efectoras a la célula del huésped. Estas son ExoY, ExoS, ExoT, y ExoU que inhiben la fagocitosis, están implicadas en la destrucción tisular y el retardo de la curación de heridas (58).

El **biofilm** es una comunidad bacteriana organizada, unida entre sí y a la superficie y su formación está muy relacionada con el *quorum sensing* (59).

P. aeruginosa secreta varias **proteasas y elastasas** que pueden degradar la elastina, fibrinógeno, colágeno, inmunoglobulinas, componentes del complemento y romper las uniones estrechas epiteliales (60).

El **lipopolisacárido** es un complejo de glucolípidos que forma la cubierta externa de la membrana bacteriana y que juega un papel importante en la antigenicidad, la respuesta antiinflamatoria y la exclusión de moléculas externas. Está formado por el lípido A, una región central polisacarídica y una región altamente variable O-polisacarídica. El lípido A va a mediar

la producción de citoquinas pro-inflamatorias, y es el causante del shock endotóxico. El polisacárido-O está formado por la banda A no variable que provoca una débil respuesta de anticuerpos, y una banda B específica que genera una fuerte respuesta de anticuerpos. Algunas cepas causantes de infección crónica pierden la expresión de la banda B, convirtiéndose la banda A en dominante para evasión del sistema inmune adaptativo (61).

Otros factores de virulencia son la **exotoxina A** que inhibe el factor de elongación 2 y por tanto la síntesis proteica de la célula hospedadora causando la muerte celular por apoptosis y la represión de la respuesta inmunitaria. Las **lipasas y fosfolipasas** rompen los lípidos y fosfolípidos de las membranas celulares del hospedador. El pigmento **piocianina** que aporta el color verde a las colonias de *P. aeruginosa* es causante de estrés oxidativo, interrumpiendo el transporte mitocondrial de electrones. La **pioverdina** actúa como quelante de hierro y como molécula de señalización para la regulación positiva de la producción de exotoxina A, endoproteasas y la propia pioverdina.

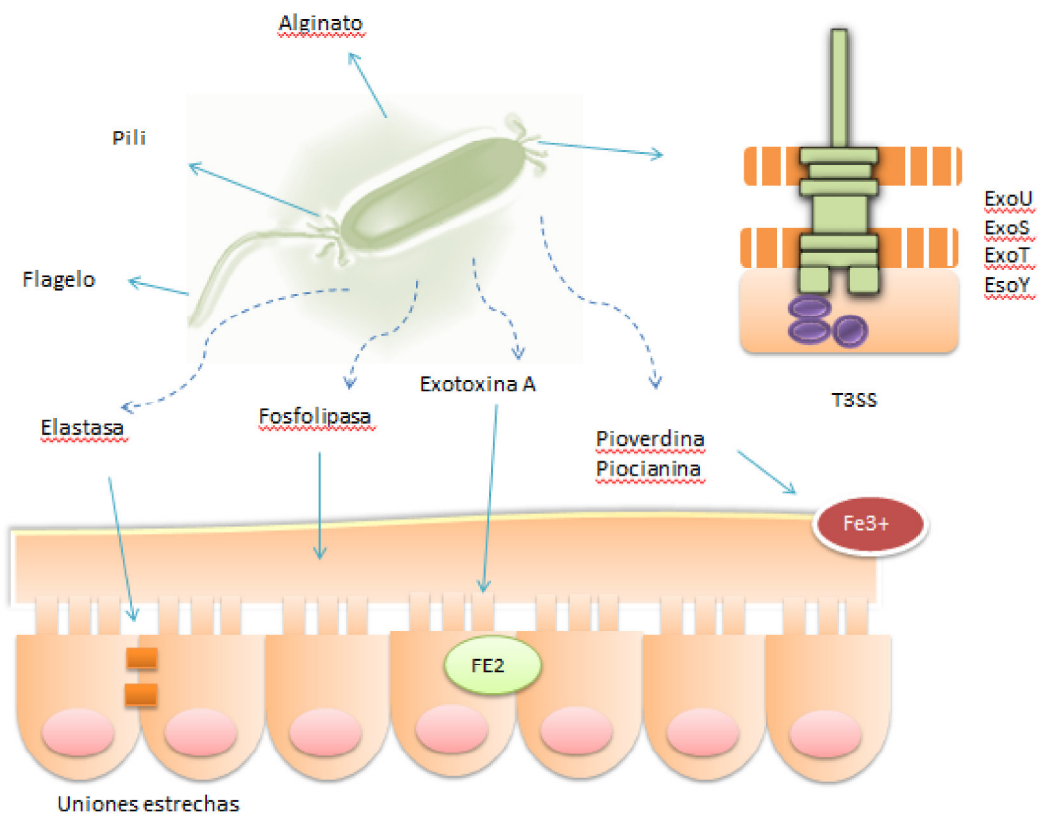


Figura 10: Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*.

2.4-Crecimiento en forma de biopelículas.

Las biopelículas (*biofilms*) son comunidades bacterianas organizadas, embebidas en una matriz extracelular polimérica asociada a una superficie vital o inerte. Están presentes en el 65-80% de las infecciones microbianas y representan una estrategia de adaptación para la supervivencia de los microorganismos en ambientes hostiles, entre los que se encuentra el ser humano (62). La matriz extracelular que envuelve el *biofilm* constituye el 85% del total de la biomasa y está formada fundamentalmente por exopolisacáridos, ADN extracelular, productos derivados de la lisis bacteriana y polipéptidos que forman un entramado altamente hidratado, que aporta estabilidad frente a fuerzas mecánicas y dificulta la entrada de antibióticos y de moléculas del sistema inmunitario (63).

Aunque algunas características generales pueden ser consideradas comunes para todas las biopelículas, según Tolker-Nielsen y Molin cada biopelícula tiene un comportamiento único (64). La estructura del *biofilm* es heterogénea y presenta cambios constantemente, derivados de procesos internos y externos.

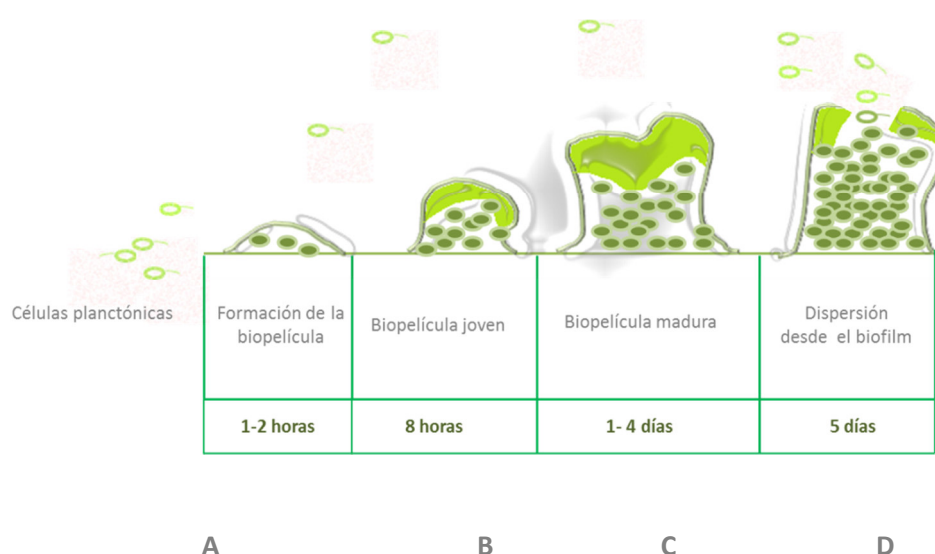


Figura 11: Esquema del proceso de formación de una biopelícula

El **proceso de formación del *biofilm*** (Figura 11) comienza con una adhesión reversible de las células planctónicas a una superficie adecuada para su crecimiento (Figura 11A), gracias a los flagelos y pili en los bacilos gramnegativos y a las proteínas de superficie en grampositivos. Después, el *biofilm* prolifera en forma de microcolonias (Figura 11B) y se comienza a producir la matriz extracelular, formándose una unión irreversible entre ambas. Estas microcolonias evolucionan, se expanden y confluyen de forma que, progresivamente, el *biofilm* resulta más estructurado (células sésiles en el interior) (Figura 11C). Finalmente se

produce la etapa de dispersión donde algunas bacterias son liberadas para colonizar nuevas superficies y comenzar el ciclo nuevamente (**Figura 11D**) (65).

P. aeruginosa produce **tres tipos de polisacáridos implicados** en la formación del biofilm: alginato, Pel y Psl. El alginato es un polímero (ácido gulurónico y ácido manurónico) que contribuye a la estabilidad y retención de agua y nutrientes. Pel y Psl son polisacáridos implicados en las etapas tempranas de la formación del *biofilm*. Los morfotipos de *P. aeruginosa* mucosos y no mucosos se diferencian en la proporción de estos polisacáridos: en los mucosos hay un predominio de alginato, mientras que en los no mucosos predominan Pel y Psl (65).

La formación del *biofilm* está regulada por una serie de señales entre las células que logran la diferenciación de las bacterias planctónicas a comunidades complejas. El **quorum sensing** es un mecanismo que detecta la densidad celular produciendo y percibiendo pequeñas moléculas llamadas autoinductores, que coordinan la producción de factores de virulencia, motilidad, y la formación de *biofilm*. En su interior, las condiciones de este *biofilm* son microaerófilas o incluso anaerobias, y *P. aeruginosa* tiene la capacidad de crecer en este ambiente utilizando NO_3^- como aceptor terminal de electrones (66). Durante el crecimiento anaerobio se ven reprimidos múltiples genes de virulencia, especialmente aquellos relacionados con la motilidad y los sistemas de secreción tipo III. Sin embargo, éstos también son responsables de la activación de la respuesta inmunológica del huésped y mientras están inactivados se hace más difícil la eliminación del patógeno.

Implicación del *biofilm* en las infecciones: el impacto clínico de los *biofilms* en las infecciones es muy grande. Están presentes sobre todo en procesos crónicos, donde los microorganismos persisten a pesar de un tratamiento adecuado. La fibrosis quística, la endocarditis en válvula nativa, la otitis media, la periodontitis y la prostatitis crónica son ejemplos de infecciones causadas por microorganismos con crecimiento en forma de *biofilm* (62).

La infección crónica por *P. aeruginosa* es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística. El crecimiento en forma de *biofilm*, junto con la resistencia antibiótica que normalmente presentan estos aislados, hace imposible su erradicación. En este ambiente existe una mayor tolerancia a los antimicrobianos, incluso hasta concentraciones 100-1000 veces mayores. Este hecho es debido principalmente a (67):

- Baja actividad de algunos antibióticos en ambientes anaeróbicos presentes en el interior del *biofilm*.

- Presencia de células persistentes frente a las cuales los antibióticos son inactivos.
- Inducción de mecanismos de resistencia, como el aumento en la expresión de bombas de flujo.
- Resistencia mutacional: la arquitectura del *biofilm* podría favorecer el desarrollo de resistencias mutacionales durante el tratamiento antibiótico.
- Transferencia de genes: dentro del *biofilm* está favorecida la transferencia genética horizontal entre bacterias.

2.4.1-Modelos *in vitro* de formación de *biofilm*

Existen diferencias en la actividad de un antibiótico frente a una población bacteriana en crecimiento planctónico respecto de la misma población cuando ha formado una biopelícula (células sésiles). Por tanto, en infecciones que cursen con la formación de biopelículas, se debería determinar su actividad *in vitro* mediante modelos que reproduzcan este crecimiento.

Hay diferentes sistemas para determinar la actividad *in vitro* de los antibióticos en biopelículas. Básicamente se dividen en métodos cerrados y abiertos. Los modelos cerrados tienen la ventaja de ser más sencillos y rápidos de realizar, y permiten un alto rendimiento al poder desarrollar múltiples biopelículas al mismo tiempo. Los modelos abiertos reproducen con más fidelidad la dinámica del *biofilm*, ya que se controlan parámetros como el flujo del medio, la llegada de nutrientes y la temperatura.

Modelos cerrados:

El método cerrado más comúnmente utilizado es el dispositivo *Calgary* (68,69)(Figura 12). Consiste en una placa de *microtiter* con 96 pocillos de fondo plano, que se inocula con el medio de cultivo y el microorganismo en estudio. Se coloca una tapa con pinchos de poliestireno, alrededor de los cuales se forma el *biofilm*, y se incuba 24 horas. Después del lavado de estos pinchos se eliminan las células planctónicas, enfrentado posteriormente el *biofilm* con el antibiótico en estudio. El resultado se puede obtener midiendo la biomasa del *biofilm* por espectrofotometría después de haber desprendido el *biofilm* por centrifugación.

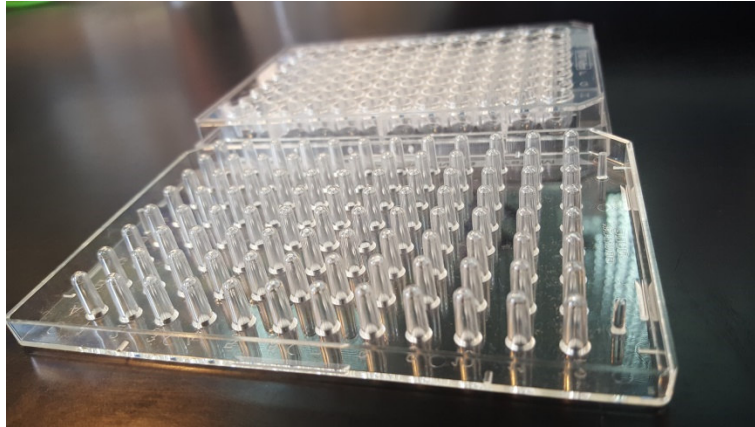


Figura 12: Modelo cerrado de biofilm-Calgary. Consta de una placa con pocillos de fondo plano donde se inocula el medio con el microorganismo y posteriormente el antibiótico y de una tapa con pinchos alrededor de los cuales se forma el biofilm.

Métodos abiertos

Los sistemas de flujo continuo remedian las condiciones para la formación de un *biofilm in vivo*, ya que el flujo continuo permite mantener las características ambientales constantes controlando la temperatura y la llegada del medio de cultivo. Estos modelos permiten además la implementación de modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos y la observación al microscopio de la formación de la biopelícula. Con este sistema, las células planctónicas se eliminan con el flujo, por lo que se asegura el análisis de las células sésiles (67).

- **Celdas de flujo:** es un tipo de sistema abierto y está constituido por un tanque que proporciona medio de cultivo a través de una bomba peristáltica multicanal y por una cámara de flujo laminar en la que se colocan las muestras para estudio. Las células bacterianas se van adhiriendo a la superficie, donde se comienza a formar la biopelícula. Todo ello está conectado por tubos de PVC o tubos de silicona. La monitorización a tiempo real se puede realizar mediante microscopía confocal. La principal desventaja de este sistema es el tiempo que requiere su realización (70).

- **Reactor de biofilm CDC:** es un sistema abierto que consta de un vaso en donde se insertan unas barras que portan unos discos sobre los que se forma la biopelícula y una varilla magnéticamente guiada que hace de agitador. El reactor de vidrio está conectado a un matraz con medio de cultivo que se va bombeando. El medio entra por unos tubos por la parte superior del vaso y sale por unos tubos situados en el lateral, estableciéndose un flujo continuo. Para el análisis de las biopelículas se extraen las barras individualmente y se analizan

las muestras contenidas en los discos, mediante raspado o a través de visualización con un microscopio (71).

- **Sistema Bioflux** (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA): este modelo abierto, desarrollado recientemente, se basa en un sistema que aplica la microfluídica empleando canales que permiten el crecimiento de las biopelículas. La novedad de este sistema es permitir que un modelo abierto consiga un alto rendimiento, ya que admite la creación de múltiples biopelículas con flujos y temperaturas controlados (72).

Los microcanales están integrados en una placa con pocillos que puede ser examinada microscópicamente a medida que el *biofilm* se va formando. La placa consta de 48 pocillos y 24 microcanales. Cada microcanal está conectado a un pocillo de entrada de medio y uno de salida (Figura 13). El medio fluye de un pocillo a otro a través de una presión neumática que puede ser regulada. Estos canales tienen un tamaño 10 veces menor que el tamaño de las celdas de flujo, lo que permite un amplio rango de velocidades de flujo y resultados uniformes a lo largo del canal. El sistema incluye un compresor de aire y reguladores electroneumáticos para controlar la presión de forma precisa en cada canal. Un *software* integrado permite manejar todos los parámetros.

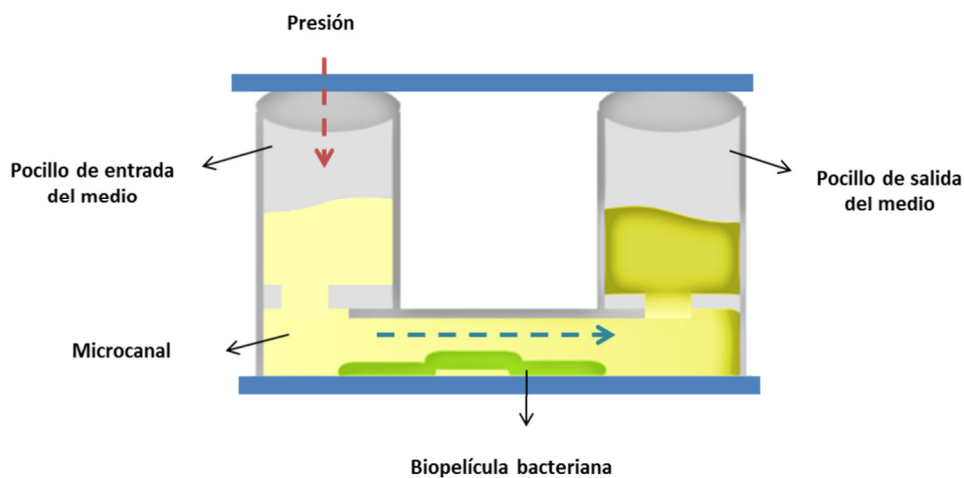


Figura 13: Sistema Bioflux: representación esquemática de los pocillos de entrada y salida unidos por un microcanal donde tiene lugar la formación de la biopelícula.

2.5-Contexto genómico

P. aeruginosa posee un genoma de 6.3 millones de pares de bases (Mpb), relativamente grande comparado con otras especies bacterianas. Posee una región conservada común para la especie, que comprende el 90% del genoma total, y una región accesoria (10% aproximadamente) que contiene genes específicos que varían de una especie a otra y que codifican proteínas reguladoras (73).

P. aeruginosa es conocida la por su gran **versatilidad metabólica**. Puede crecer en medios muy deficitarios de nutrientes y a diferencia de otras especies como *E. coli*, tiene preferencia por crecer en medios con ácidos tricarboxílicos, en lugar de medios enriquecidos con azúcares. Para ello, tiene cerca de 300 sistemas transportadores de membrana citoplasmáticos, de los cuales dos tercios están implicados en el transporte de nutrientes y otras moléculas. La mayoría de ellos transportan mono-, di-, y tri-carboxilatos, mientras que posee muchos menos transportadores de azúcares. Así mismo, tiene numerosos genes que codifican enzimas implicados en la β -oxidación (73).

Junto con su gran capacidad de diversidad metabólica, otra de las características más importantes de *P. aeruginosa* es el gran número de genes reguladores que codifica. Se ha demostrado que las especies bacterianas capaces de sobrevivir en distintos ambientes pueden codificar un amplio número de proteínas reguladoras, a diferencia de aquellas bacterias que son más específicas de un solo nicho. En *P. aeruginosa* la mayoría de estas proteínas reguladoras pertenecen al **sistema de regulación de dos componentes** que modula la capacidad genética y bioquímica de la bacteria para adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales. Estos sistemas reguladores también están implicados en la virulencia y la resistencia antibiótica (73).

2.6-Resistencia a antibióticos

El tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* constituye en muchos casos un auténtico reto clínico, ya que este microorganismo posee mecanismos de resistencia intrínseca a diversos antibióticos, y además puede desarrollar resistencias durante el tratamiento mediante mutaciones cromosómicas o a través de la adquisición horizontal de genes de resistencia de elementos móviles como plásmidos o integrones.

La resistencia intrínseca se puede relacionar con distintos factores: escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de la β -lactamasa AmpC inducible y distintos sistemas de expulsión activa (**Figura 14**).

2.6.1-RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

β -lactamasa cromosómica AmpC

P. aeruginosa produce una β -lactamasa cromosómica inducible de tipo AmpC que es la responsable de la resistencia a aminopenicilinas y a cefalosporinas de espectro reducido.

Esta enzima se puede inducir y expresarse a alto nivel por mutaciones cromosómicas que afectan a las proteínas involucradas en su inducción. La desrepresión de AmpC puede ser completa o parcial. Cuando es completa expresa resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos excepto a los carbapenémicos.

β -lactamasas de clase A

Dentro de las β -lactamasas de clase A-no BLEE se encuentra las del **grupo 2c de Bush** que se caracterizan por hidrolizar la carbenicilina, ticarcilina y piperacilina y se inhiben con ácido clavulánico y tazobactam. Dentro de este grupo se encuentran: TEM 1-2, PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3, CARB-4.

Las β -lactamasas de clase A de espectro extendido (BLEE) que pertenecen al **grupo 2b de Bush** hidrolizan las carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepime y aztreonam, y también se inhiben con ácido clavulánico y tazobactam. Se han descrito varias enzimas de tipo BLEE: tipo TEM (TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42, TEM-116) y SHV (SHV-2a, SHV-5, SHV-12) y PER (PER-1), VEB (VEB-1, VEB-1a, VEB-1b, VEB-2), GES (GES-1, GES-2, GES-5, GES-8, GES-9) y BEL. Los genes que codifican estas enzimas se encuentran en el cromosoma, plásmidos o integrones. GES-1 a diferencia de la mayoría de BLEEs de clase A se caracteriza por tener una fuerte afinidad por cefoxitina. GES-2 sin embargo hidroliza los carbapenems, por lo que se considera como una carbapenemasa de clase A.

β -lactamasas de clase D (oxacilinasas)

Las β -lactamasas de clase D pertenecen a un grupo muy diverso de enzimas que están codificadas en plásmidos o integrones. No se inhiben con ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Las enzimas OXA clásicas (OXA-1, OXA-2, OXA-10) hidrolizan carboxipenicilinas y ureidopenicilinas pero no ceftazidima. Las enzimas OXA que derivan de las clásicas (OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-19, OXA-32) afectan sobre todo a ceftazidima, con actividad variable sobre cefepime y aztreonam. OXA-40 hidroliza carbapenémicos sin afectar a cefalosporinas de amplio espectro.

β -lactamasas de clase B (metalo- β -lactamasas)

Determinan resistencia a los antibióticos β -lactámicos incluidos los carbapenémicos con excepción de los monobactámicos como el aztreonam. Estas enzimas requieren la presencia de

Zinc $^{2+}$ en su centro activo y pueden ser inhibidas por quelantes iónicos divalentes como el EDTA. Existen cuatro tipos descritos en *P. aeruginosa*: IMP, VIM, SPM y GIM. Están localizadas en integrones localizados en plásmidos o en el cromosoma.

Alteración de la permeabilidad-Porina OprD

La membrana externa representa una barrera semipermeable, que en *Pseudomonas* es mucho menos permeable que en el caso de otros bacilos gramnegativos. La entrada de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño se produce a través de canales llenos de agua llamados porinas. La porina OprD permite el paso de carbapenémicos, y su modificación se traduce en un aumento de resistencia a estos compuestos.

Sistemas de expulsión activa

Existen varios sistemas de expulsión activa que pertenecen a la familia RND (*resistance-nodulation-division*) y pueden afectar a distintas clases de antibióticos: β -lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, lincomicina, novobiocina. Éstos son: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM.

MexAB-OprM y MexXY-OprM participan en mecanismos de resistencia natural y adquirida, mientras que MexCD-OprJ y MexEF-OprN sólo actúan en casos de resistencia adquirida.

Los fenotipos de resistencia resultantes de estos sistemas están recogidos en la **Tabla 2**.

La sobreproducción de **MexAB-OprM** se produce por mutaciones en el gen cromosómico regulador *mexR*. El gen *nfxB* regula también negativamente el operón ***mexCD-OprJ***, y su mutación produce la hiperexpresión de este sistema, afectando preferentemente a cefalosporinas de 4ª generación. ***mexEF-OprN*** a diferencia de los anteriores está regulado positivamente por el gen *mexT* y su sobreexpresión afecta a la sensibilidad de fluoroquinolonas y carbapenémicos, especialmente imipenem por su asociación con la pérdida de la porina OprD. ***mexXYOprM*** está regulado negativamente por *mexZ*.

TICAR	T/TZ	PIP	P/TZ	CAZ	CPE	ATM	IMI	MERO	Mecanismo
S	S	S	S	S	S	S	R	r	Porina OprD
R	R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	r	MexAB-OprD
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r/R	S	S	MexCD-OprJ
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r	MexEF-OprN
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	S	MexXY-OprM

Tabla 2: Fenotipos de resistencia a β -lactámicos resultantes de los diferentes sistemas de expulsión activa y por la alteración en la permeabilidad de la porina OprD.

TICAR: Ticarcilina, T/TZ: Ticarcilina/tazobactam, P/TZ: Piperacilina/tazobactam, CAZ: Ceftazidima, CPE: Cefepime, ATM: Aztreonam, IMI: Imipenem, MERO: Meropenem

2.6.2-RESISTENCIA A FLUOROQUINOLONAS

La resistencia a fluoroquinolonas en *P. aeruginosa* se debe a cambios estructurales en la diana por mutaciones puntuales en genes que codifican para ADN girasa y topoisomerasa IV y a la sobreexpresión de los sistemas de expulsión activa Mex. Cuando se dan de forma conjunta se produce una resistencia de alto nivel.

2.6.3-RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS

El mecanismo más frecuente de resistencia a aminoglucósidos se debe a la modificación enzimática del antibiótico resultando en una menor afinidad por la subunidad 30S del ribosoma. Los genes que codifican las enzimas están localizados en integrones de clase 1 y transmiten por vía horizontal. Según el radical sobre el que actúen pueden ser: **APH**: fosforiltransferasas, **ANT**: adeniltransferasas, **AAC**: acetiltransferasas.

La resistencia también se puede deber a la metilación de la subunidad 16S del ARN ribosómico por medio de enzimas (**metilasas**) cuyos genes están codificados en un transposón localizado en un plásmido.

En **fibrosis quística** sin embargo, el mecanismo más frecuente de resistencia a aminoglucósidos es cromosómico y se debe al sistema de expulsión activa MexXY-OprM. La hiperproducción de esta bomba es debida a mutaciones en el gen *mexZ* que codifica la proteína represora MexZ o en la región intergénica *mexZ-mexX* (74). Este tipo de mutantes se denominan *agrZ* (*aminoglycoside resistant mutants dependent on mexZ*), y producen normalmente resistencia a todos los aminoglucósidos. Aunque este tipo *agrZ* es el más común,

hay estudios en los que se describe la hiperexpresión de MexXY con ausencia de mutaciones en *mexZ* o en la región promotora *mexXY* (75). En trabajos posteriores se describen 2 tipos de mutantes más, con hiperproducción de MexXY: *agrW1* y *agrW2*.

agrW1 son mutantes con alteraciones en la síntesis proteica. El estrés oxidativo, un componente del sistema inmunitario en el pulmón de pacientes con fibrosis quística, puede inducir la expresión de *mexXY* vía PA5471. El gen PA5471 codifica una proteína de función desconocida que por acción directa e indirecta sobre MexZ disminuye su expresión y puede causar así la resistencia a aminoglucósidos (76).

agrW2 son mutantes con alteración en *parRS* que es un sistema de transducción de doble señal que regula MexXY-OprM y OprD (77).

En la **Tabla 3** están recogidos los principales fenotipos de resistencia a los diferentes aminoglucósidos según el mecanismo de resistencia implicado.

CN	TOB	NT	AK	CIP	MECANISMO DE RESISTENCIA
S	S	S	S	S	-
R	S	S	S	-	AAC(3)-I
R	R	R	S	-	AAC(3)-II
r	R	R	R	-	AAC(6')-I
R	R	R	S	-	AAC(6')-II
R	R	S	S	-	ANT (2')-I
R	R	R	R	-	Metilación Ribosómica
r	r	r	r	r	MexXY-OprM
					ENZ+ MexXY-OprM
R	R	R	R	r	+Impermeabilidad

Tabla 3: Fenotipos de resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas en *P. aeruginosa*. CN: Gentamicina, TOB: Tobramicina, NT: Netilmicina, AK: Amicacina, CIP: Ciprofloxacino.

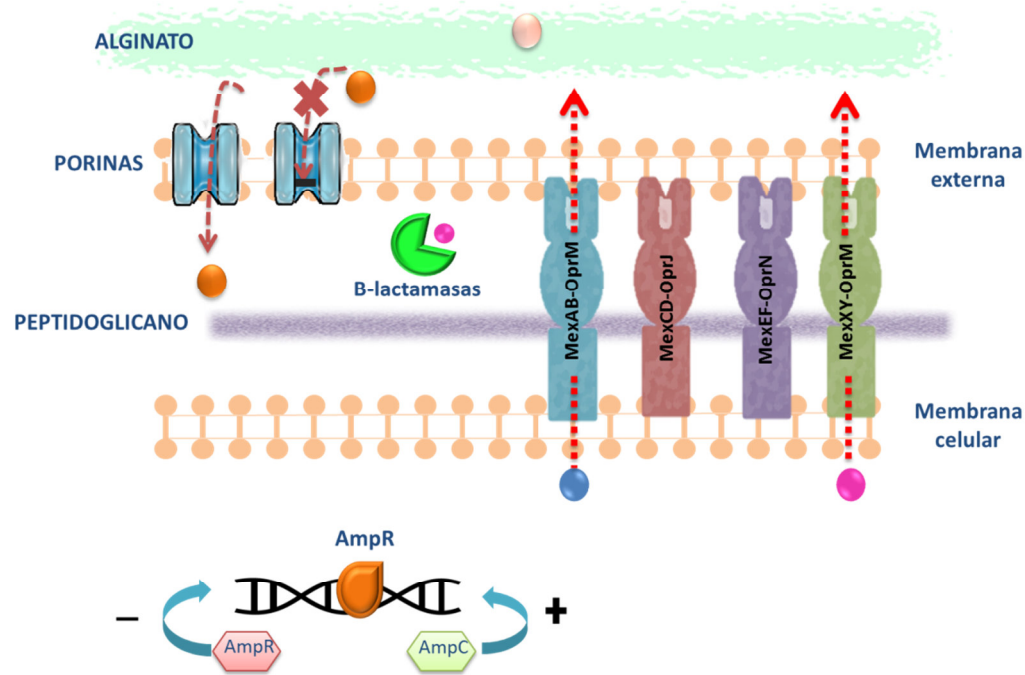


Figura 14: Esquema de los diferentes mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*: Expulsión activa por sistemas Mex. Alteración en la expresión de porinas. Hidrólisis por β -lactamasas en el espacio periplásmico. Inducción/desrepresión del sistema AmpC. Capa de alginato que dificulta la entrada de antibióticos.

2.7-Problema epidemiológico de la multirresistencia en *P. aeruginosa*

En Europa las tasas de multirresistencia de *P. aeruginosa* varían según el país. De acuerdo al último informe anual publicado de la EARS (2013), el porcentaje más alto de aislados invasivos de *P. aeruginosa* multirresistente (considerando resistencia a 3 o más grupos de las siguientes familias de antibióticos: piperacilina/tazobactam, ceftazidima, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenems) se registró en Eslovaquia (36.1%), Grecia (39.15%), y Rumanía (49.4%). Mientras que las cifras más bajas se registraron en Islandia (0%), Estonia (0%) y Dinamarca (1.7%). España presentó un porcentaje del 12.2% (**Figura 15**).

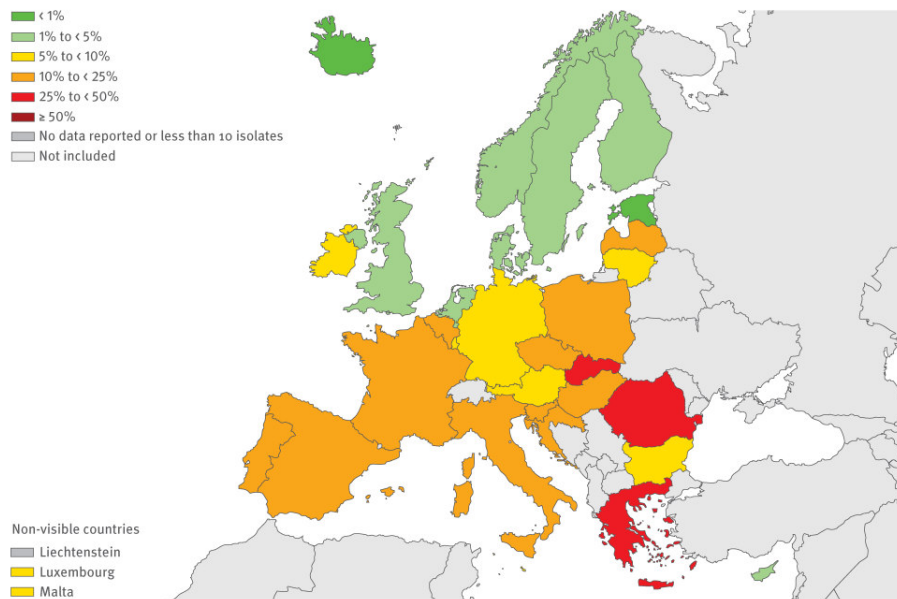


Figura 15: Tasas de multirresistencia de *P. aeruginosa* según la EARS (2013)

La multirresistencia en *P. aeruginosa* es un problema hospitalario que va en aumento y que afecta sobre todo a unidades de cuidados intensivos donde se han descrito brotes (78,79). En muchos países europeos, principalmente del área mediterránea, la resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas* es una situación endémica. El mecanismo de resistencia a estos compuestos más comúnmente identificado es debido a metalo-carbapenemasas (MBL) de tipo VIM (80). Según el programa longitudinal MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) que se realiza desde el año 1997, la incidencia de *P. aeruginosa* multirresistente en unidades de cuidados intensivos fue de hasta el 50% en países como Turquía, mientras que en España, Reino Unido, Alemania, Bulgaria y Malta es del 3% (81).

3-Concepto de hipermutación

Cepas hipermutadoras son aquellas que tienen una frecuencia de mutación espontánea 20 veces mayor que la población salvaje. Estas cepas se aíslan en infecciones crónicas como la fibrosis quística y EPOC, mientras que no se encuentran en infecciones agudas. Se ha estimado que hasta el 37% de los pacientes con fibrosis quística están colonizados por cepas hipermutadoras (82).

Esta característica se debe a un proceso de adaptación al entorno, por defectos en los sistemas de reparación del ADN o sistema de reparación de emparejamientos erróneos *mismatch-repair* (MMR) durante la replicación bacteriana, siendo *mutS* el gen mayormente afectado (82). La acumulación de mutaciones hace que estas variantes sean más resistentes a los antibióticos y al sistema inmune y puedan persistir. Sin embargo, tienen un coste biológico asociado ya que las cepas son menos virulentas.

Se ha establecido que las cepas hipermutadoras se consideren resistentes a todos los antibióticos en monoterapia, y que su tratamiento se base en combinaciones antibióticas que eviten el desarrollo de mutantes resistentes (83).

4-Concepto de concentración preventiva de aparición de mutantes y ventana de selección

A concentraciones mayores que la CMI, la población bacteriana sensible es inhibida, mientras que una minoría de la población, que posee mecanismos de resistencia, se podría seleccionar. Estos mutantes resistentes pueden ser inhibidos por concentraciones más altas que la CMI; la concentración de antibiótico que inhibe los mutantes de primer nivel dentro de una población sensible se denomina **concentración que previene la aparición de mutantes (CPM)**. El rango de concentraciones por encima de la CMI y por debajo de la CPM es la ventana de selección de mutantes (VSM) (**Figura 16**).

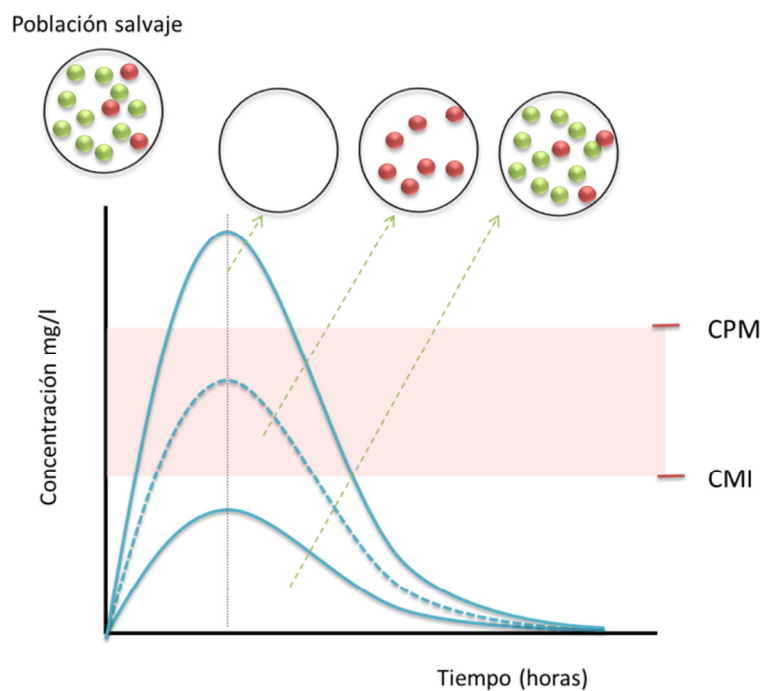


Figura 16: En esta figura se representan 3 opciones farmacocinéticas. La curva farmacocinética por debajo de la CMI en la que no se inhibe la población salvaje, ni se seleccionan mutantes resistentes. La curva farmacocinética entre la CMI y la CPM donde se inhibe la población salvaje, pero se seleccionan los mutantes resistentes. La curva farmacocinética por encima de la CPM donde se inhibe tanto la población salvaje como los mutantes resistentes.

Una vez que la concentración de antibiótico sobrepasa la CPM en el lugar de la infección, la aparición de resistencia es poco probable.

A diferencia de la CMI, para cuya determinación se utiliza un inóculo de 10^4 - 10^5 UFC/ml, el cálculo de la CPM necesita de un inóculo mayor (10^9 - 10^{10} UFC/ml) para asegurar la presencia de mutantes dentro de esta población.

Mediante una doble terapia antimicrobiana se prevendría la aparición de mutantes resistentes a ambos antibióticos, siendo beneficioso sobre todo cuando la frecuencia de mutación al antimicrobiano es elevada.

5-Concepto de punto de corte epidemiológico (ECOFF)

Desde un punto de vista clínico-microbiológico, la resistencia a un antimicrobiano viene definida por el punto de corte clínico, que es el valor de CMI que separa a los microorganismos que son considerados clínicamente sensibles o que tienen una alta probabilidad de éxito terapéutico, de aquellos que son considerados como clínicamente resistentes o que tienen una alta probabilidad de fracaso terapéutico. El punto de corte epidemiológico o ECOFF es el valor de CMI que separa la población salvaje, que carece de mecanismos de resistencia adquiridos, de aquella que posee mecanismos de resistencia, ya sea por mutaciones o como consecuencia de transferencia horizontal de genes (**Figura 17**).

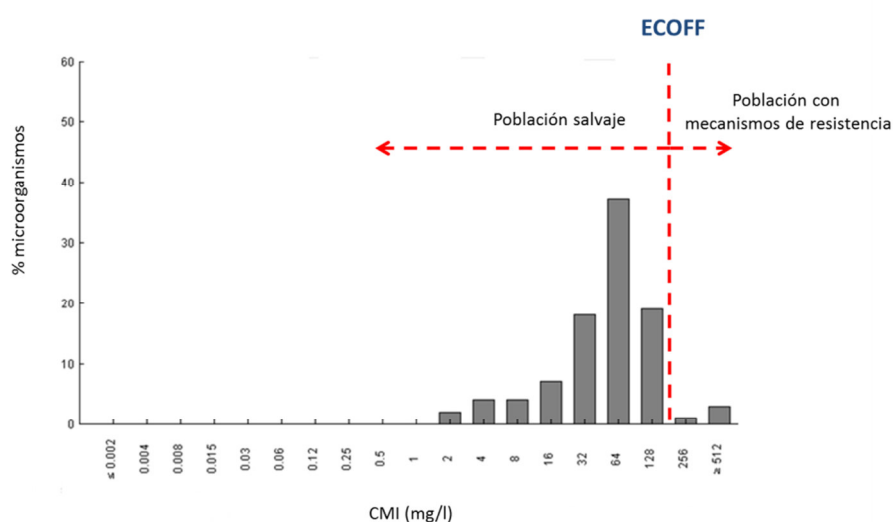


Figura 17: Figura adaptada de EUCAST en la que se representa la distribución de CMI a fosfomicina para *P. aeruginosa*, con un valor de ECOFF de 128 mg/l que separa la población salvaje de aquella que posee mecanismos de resistencia.

El cálculo de ECOFF se puede realizar de varias formas: calculando la moda más una dilución al doble que incluya al 95% de la población salvaje (84), o la CMI₅₀ más dos diluciones al doble.

En el caso de fosfomicina, no existe un punto de corte clínico para *P. aeruginosa* y únicamente existe un punto de corte epidemiológico (128 mg/l) establecido por EUCAST (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*).

6-Concepto de sinergia antibiótica -Curvas de muerte-

La asociación de antimicrobianos es una práctica frecuente en la clínica con el objetivo de aumentar el espectro antimicrobiano, así como minimizar los efectos tóxicos y el desarrollo de resistencias. Para la evaluación del efecto *in vitro* de estas asociaciones existen diferentes técnicas, como el método del tablero en ajedrez, sinergias con tiras de gradiente de CMI, el test de múltiples combinaciones antibióticas y los ensayos de curvas de muerte bacteriana. El propósito de estos ensayos es medir la actividad de las combinaciones antibióticas y determinar si el efecto de la asociación es mayor que la suma de ambos antibióticos por separado, este sería el caso de la sinergia antibiótica. Estos métodos también son capaces de identificar combinaciones que puedan ser antagónicas o indiferentes.

En las curvas de muerte bacteriana se determina la actividad de los antibióticos y de las combinaciones a lo largo de 24 horas, por lo que se considera un método dinámico que proporciona información sobre la muerte bacteriana a lo largo del tiempo. La realización de este método fue estandarizada en 1999 por el *National Committee on Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility*, M100-S24) (38) y actualmente está establecido como método de referencia.

Sin embargo, aunque más de la mitad de las infecciones se tratan con doble terapia, todavía se necesitan estudios que correlacionen datos clínicos con los resultados obtenidos con métodos *in vitro* (85) para reforzar el uso de estas técnicas en el laboratorio.

PLANTEAMIENTO E HIPÓTESIS DEL TRABAJO

La realización de este trabajo surge a raíz del problema de la escasez de opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de los pacientes con infecciones por microorganismos resistentes a múltiples antibióticos como muchas veces ocurre con *P. aeruginosa*. Ante este escenario, se recurre a la utilización de antiguos antibióticos como es el caso de la fosfomicina. Sin embargo, el conocimiento que existe sobre su uso clínico y su actividad microbiológica frente a este microorganismo es por el momento muy escaso.

De este modo, con el objetivo de profundizar y afianzar el conocimiento de las características antimicrobianas de la fosfomicina, se ha desarrollado esta tesis doctoral en la que se investiga su actividad *in vitro* frente a *P. aeruginosa*. El trabajo se desarrolla en tres capítulos:

- En el **primer capítulo** se establece la caracterización fenotípica de la resistencia a la fosfomicina en *P. aeruginosa* y las concordancias entre los métodos de determinación de sensibilidad respecto al método de referencia. Así mismo, se analizan distintos factores que influyen en el resultado de la sensibilidad.
- En el **segundo capítulo** se determina la actividad *in vitro* de fosfomicina en combinación con diferentes antibióticos utilizando curvas de muerte bacteriana. Así mismo, se estudia la concentración preventiva y la ventana de selección de mutantes de fosfomicina, sola y en asociación con tobramicina, en ambiente aeróbico y anaeróbico y se caracterizan los aislados resistentes a nivel molecular.
- En el **tercer y último capítulo** se estudia la formación de biopelículas por parte de *P. aeruginosa* con distintos modelos *in vitro* (modelo abierto y cerrado) y la actividad que fosfomicina, tobramicina y la combinación de ambas tiene sobre ellas.

Con los resultados obtenidos se pretende reforzar el conocimiento sobre este antibiótico como alternativa en el tratamiento de los pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente.



Capítulo 1

CAPÍTULO 1º

“VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE MICRODILUCIÓN, DIFUSIÓN CON DISCOS Y TIRAS DE GRADIENTE DE CONCENTRACIONES ANTIBIÓTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Pseudomonas aeruginosa* A FOSFOMICINA”

CAPÍTULO 1º:**VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE MICRODILUCIÓN, DIFUSIÓN CON DISCOS Y TIRAS DE GRADIENTE DE CONCENTRACIONES ANTIBIÓTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Pseudomonas aeruginosa* A FOSFOMICINA.****1-OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 1º**

Actualmente, el método de referencia para determinar la sensibilidad de *P. aeruginosa* a fosfomicina es la dilución en agar (38). Sin embargo, este método es laborioso y su realización en la rutina de los laboratorios clínicos es impracticable. En su lugar se utilizan los métodos de microdilución con sistemas automáticos y los métodos de difusión como las tiras de gradiente de concentraciones o los discos de fosfomicina, si bien para estos dos últimos no se ha establecido el grado de concordancia con el método de referencia.

Por ello, los objetivos del trabajo que se detallan en este primer capítulo fueron:

- Conocer la distribución de las CMI's de fosfomicina en una colección de aislados clínicos de *P. aeruginosa* genéticamente no relacionados. Determinación de las CMI's poblacionales.
- Validación de los métodos de: 1) Microdilución, 2) Difusión con discos y 3) Tiras de gradiente de concentraciones para la determinación de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a fosfomicina.
- Evaluación de un inóculo alternativo para la determinación de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a fosfomicina mediante los métodos de difusión.
- Estudio de los distintos factores que influyen en el resultado de la sensibilidad *in vitro* de *P. aeruginosa* a fosfomicina.

2-MATERIAL Y MÉTODOS

2.1-Cepas estudiadas

Cepa control

En los estudios de sensibilidad se utilizó como control la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Cepas clínicas

Se incluyeron 206 cepas de *P. aeruginosa* de una colección perteneciente al estudio COMPACT (86), obtenidas de neumonías nosocomiales, sepsis e infección intraabdominal, procedentes de pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos y en diferentes unidades médicas.

Esta colección está genéticamente caracterizada por campo pulsado (PFGE) y *multilocus sequence typing* (MLST), y su sensibilidad antibiótica ha sido estudiada por microdilución (86). Un total de 148 de estos 206 aislados era sensible a los carbapenémicos y 58 eran resistentes, al menos, a uno de estos compuestos (meropenem, imipenem y doripenem).

Todas las cepas se guardaron congeladas a -70º C en leche semidesnatada hasta el momento de su estudio.

2.2-Estudio *in vitro* de la sensibilidad antibiótica de *P. aeruginosa* a fosfomicina.

El estudio *in vitro* de la sensibilidad antibiótica refleja la capacidad de un antimicrobiano para inhibir el crecimiento de una población bacteria determinada. Su resultado, mediante el cálculo de la CMI, definida como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible del inóculo bacteriano, permite predecir la eficacia clínica del compuesto estudiado.

Además, existen valores de CMIs poblacionales que se definen como CMI₅₀ y CMI₉₀ que corresponden al valor de la CMI del 50% y del 90% de la población bacteriana a estudio, respectivamente.

La determinación de la sensibilidad antibiótica a fosfomicina en la colección de aislados clínicos de *P. aeruginosa* a estudio, se realizó mediante diferentes métodos y todos ellos se compararon con el método de referencia (dilución en agar):

-**Métodos de dilución:** dilución en agar y microdilución -

-**Métodos de difusión:** tiras de gradiente de concentraciones (Etest®) y discos. -

2.2.1-Métodos de dilución

Para la realización del método de **dilución en agar** se utilizó fosfomicina en polvo de potencia establecida (Laboratorios Ern, S.A., Barcelona, España) y Mueller-Hinton II agar BBL con concentración de cationes ajustada (Becton Dickinson [BD], Sparks, MD, EE.UU). En determinados experimentos, al agar se añadieron 25 mg/l de glucosa 6-fosfato (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU). Se prepararon placas con diluciones dobles seriadas de fosfomicina que se inocularon, mediante un replicador de Steers, a una concentración final de 10^4 UFC/punto de inoculación. Las placas se incubaron durante 18-20 horas a 37°C.

Para el método de **microdilución**, se preparó un inóculo correspondiente al 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml) que se diluyó 1:1000 en caldo Muller-Hinton II con concentración de cationes ajustada (Becton Dickinson [BD], Sparks, MD, EE.UU) para alcanzar una concentración final de 10^4 - 10^5 UFC/pocillo. Se emplearon placas de 96 pocillos de fondo redondo con un volumen final de 100 µl (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EE.UU) que se incubaron durante 18-20 horas a 37°C.

En ambos métodos se utilizó un rango de concentraciones de 1-1024 mg/l. Las determinaciones se realizaron por duplicado y en el mismo día.

2.2.2-Métodos de difusión

Tiras de gradiente de concentraciones

La tira de Etest® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), utilizada en este trabajo, consiste en un soporte plástico inerte sobre el cual se ha inmovilizado un gradiente predefinido del antimicrobiano correspondiente. La tira se coloca sobre la superficie de una placa de agar Muller-Hinton, previamente inoculada con la suspensión bacteriana (0.5 McFarland). El valor de la CMI corresponde al punto de intersección de la tira con la elipse de inhibición del crecimiento bacteriano. En este trabajo se utilizaron tiras Etest® de fosfomicina con 25 µg/ml de G6P. Se determinaron las CMIs utilizando dos tipos de inóculos bacterianos: 1.5×10^8 UFC/ml que corresponde al inóculo estandarizado de 0.5 McFarland y una dilución 1:100 de ésta, que se consideró como un inóculo "alternativo" (1.5×10^6 UFC/ml). Las placas se incubaron 18-24 horas a 37°C.

Discos

La difusión con discos es una técnica cualitativa que permite, al igual que cuando se utilizan técnicas que permiten el cálculo de la CMI, categorizar a la bacteria como sensible (S), con sensibilidad intermedia (I) o resistente (R) al antimicrobiano contenido en dicho disco. Se

utilizaron discos de fosfomicina de dos concentraciones: 200 µg (BD) y 50 µg (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido). Al igual que con las tiras de gradiente, se utilizaron dos tipos de inóculos bacteriano: 1.5×10^8 UFC/ml y 1.5×10^6 UFC/ml.

Las determinaciones mediante estos dos métodos se realizaron por duplicado y en el mismo día.

2.3-Estudio del mecanismo de resistencia a fosfomicina en *P. aeruginosa* mediado por el gen *glpT*. Amplificación y secuenciación de *glpT*.

La amplificación del gen *glpT* se realizó a partir de ADN genómico extraído mediante el kit comercial QiAmp (Qiagen GmbH, Hilden Alemania). Se suspendió un inóculo bacteriano de cultivo en placa de LB de 24 horas en una solución de lisis y se realizó un tratamiento de la muestra con proteinasa K. Se centrifugó el lisado bacteriano y el sobrenadante se purificó mediante columnas de sílice donde el ADN se adsorbe específicamente. Finalmente, se lavó la columna para eliminar posibles contaminantes y se eluyó el ADN con agua estéril.

Para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cebadores utilizados y las condiciones se especifican en la **Tabla 4**.

CEBADORES		CONDICIONES
<i>glpT</i> -F	5'-AGCGGAGCTCGCGATGTTC-3'	94°C, 12'
<i>glpT</i> -R	5'-TCAGCCGGCTTGCTGCGG-3'	94°C, 1'
CEBADORES "Walking"		58°C 45''
<i>glpT</i> -Fw	5'-TGCTCTGCGGCTGGCTGTCGG-3'	72°C, 1'
<i>glpT</i> -Rw	5'-AATGAACATCACCGCCGCC-3'	72°C, 10'

Tabla 4: Cebadores y condiciones utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *glpT*

Los cebadores "walking" se utilizaron con el fin de obtener la secuenciación completa. Estos cebadores se suelen utilizar en secuencias muy largas y que no pueden ser completadas con los cebadores directo (F) y reverso (R) (**Figura 18**).

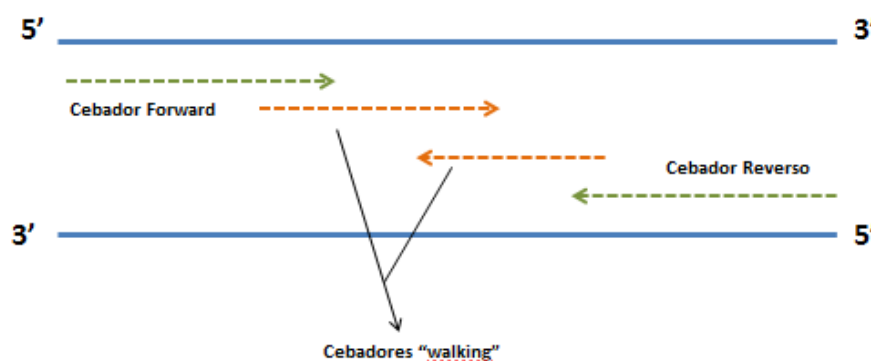


Figura 18: Esquema del tipo de cebadores utilizados para la secuenciación del gen *glpT*:

Cebador Directo y Reverso y Cebadores “walking”.

Se utilizó la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, CONN, EE.UU) (1,5 U) que es una polimerasa de alta fidelidad y especificidad que, debido a su activación a altas temperaturas, disminuye la posibilidad de formación de productos inespecíficos aumentando el rendimiento.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1,5% disuelta en tampón TBE (0.5X) (Tris Borato, EDTA) y se visualizaron por tinción con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EE.UU) a una concentración final de 3X. El GelRed™ es un agente que se intercala en el ADN y que permite visualizar las moléculas de ácido nucleico mediante luz ultravioleta.

Los productos amplificados se purificaron con el kit UltraClean® PCR Clean-Up Kit (MO BIO laboratorios, Carlsbad, CA, EE.UU). La secuenciación se realizó mediante un secuenciador automático 373XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó mediante el programa Chromas Lite (versión 2.1, Technalysian pty. Ltd, Tewantin, Australia). Las mutaciones de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se analizaron con el software Clone Manager 9 (Scientific and Educational Software) y MEGA 5.0.

2.4-Análisis de los resultados

Para establecer el grado de concordancia entre los métodos de determinación de sensibilidad, se consideró como método de referencia la dilución en agar Muller-Hinton y para la validación se siguieron los criterios establecidos en el documento Cumitech 31A de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) (87). Al no existir punto de corte clínico para *P. aeruginosa*

y fosfomicina, se consideró el ECOFF establecido por EUCAST (128 mg/l) para la categorización de la sensibilidad de las cepas estudiadas.

Se consideró que hubo **acuerdo esencial** cuando el resultado de la CMI obtenido por el método a evaluar, no varió en más de ± 1 dilución respecto al obtenido por el método de referencia. Se consideró que hubo **acuerdo de categoría** cuando la interpretación de sensibilidad (S o R) por el método a evaluar, coincidió con el método de referencia. Las discrepancias entre los resultados fueron categorizadas como **errores graves** cuando el microorganismo fue clasificado como sensible por el método de referencia y resistente por el método a evaluar (falsa resistencia); **errores muy graves** cuando el método a evaluar clasificó el microorganismo como sensible y el método de referencia como resistente (falsa sensibilidad). Los valores que se consideraron como aceptables fueron los siguientes:

- **Acuerdo esencial:** $\geq 90\%$

$$(\text{N}^\circ \text{ aislados con CMI dentro de } \pm 1 \text{ dilución}) / (\text{N}^\circ \text{ total de microorganismos}) \times 100$$
- **Acuerdo de categoría:** $\geq 90\%$

$$(\text{N}^\circ \text{ aislados clasificados con la misma categoría}) / (\text{N}^\circ \text{ total de microorganismos}) \times 100$$
- **Errores muy graves:** $\leq 3\%$

$$(\text{N}^\circ \text{ aislados con discrepancias muy graves}) / (\text{N}^\circ \text{ aislados resistentes por método de referencia}) \times 100$$
- **Errores graves:** $\leq 3\%$

$$(\text{N}^\circ \text{ aislados con discrepancias graves}) / (\text{N}^\circ \text{ aislados sensibles por método de referencia}) \times 100$$

Así mismo, el análisis de concordancia entre técnicas se realizó por el método de **Bland-Altman** (88). Este método bioestadístico consiste en un gráfico de dispersión que evalúa la concordancia entre dos métodos. Se representa la diferencia entre cada pareja de valores (A-B en la ordenada) frente a la media de cada pareja de valores (A+B)/2 en el eje de abscisas. Con este método se evalúan las diferencias sistemáticas, líneas de tendencia y detección de valores extremos. En el caso de que los valores de CMI coincidan con ambos métodos, los puntos se distribuyen a lo largo de la línea central. Las líneas a un lado y otro de la línea central corresponden a ± 1 dilución de diferencia (acuerdo esencial). La línea discontinua representa la tendencia entre las dos variables (media y diferencia).

Los valores fueron expresados como intervalo de confianza exacto del 95%. El \log_2 de los valores de CMI obtenidos con los distintos métodos se comparó así mismo con un test no

paramétrico (Wilcoxon Rank Sum Test) y la significación estadística se estableció con un valor de $P < 0.05$.

El índice Kappa, que da una medida del porcentaje de acuerdo entre las categorías de sensibilidad obtenida por los diferentes métodos ajustando el efecto del azar, fue interpretado por la clasificación descrita por Landis y Koch (< 0.00 sin acuerdo, $0.00-0.20$ insignificante, $0.21-0.40$ discreto, $0.41-0.60$ moderado, $0.61-0.80$ sustancial, $0.81-1.00$ casi perfecto) (89).

Otro índice que se calculó para determinar el grado de concordancia entre las CMI obtenidas por los distintos métodos, fue el coeficiente de correlación intraclase.

Para medir la asociación lineal entre el halo de los discos obtenido y los valores de CMI de la dilución en agar se calculó el índice de Spearman y se representó la recta de regresión lineal.

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico STATA para Windows versión 11.0.

3-RESULTADOS

3.1-Distribuciones de los valores de CMI de fosfomicina para *P. aeruginosa*. Cálculo de CMI poblacionales. Concordancia entre los métodos de dilución en agar y la microdilución (Anexo 1).

Se comparó la distribución de las CMI de fosfomicina obtenida por dilución en agar para las cepas sensibles y para las resistentes a, al menos, un carbapenem, y se comprobó que ambas distribuciones fueron similares independientemente de su sensibilidad a los carbapenémicos (Figura 19).

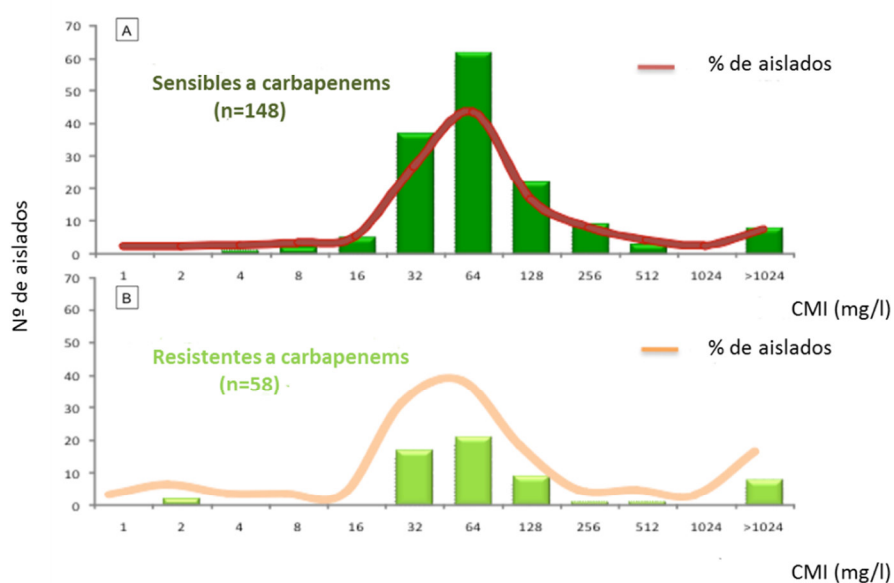


Figura 19: Distribución de CMI de fosfomicina para las dos poblaciones de *P. aeruginosa* estudiadas. A) Distribución de CMI de fosfomicina de la población de *P. aeruginosa* sensible a carbapenémicos. B) Distribución de CMI de fosfomicina de la población de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Teniendo en cuenta la totalidad de los aislados, tanto la distribución de CMI obtenida por microdilución como la obtenida por el método de dilución en agar resultaron prácticamente superponibles a la distribución de CMI de fosfomicina definida por EUCAST para este microorganismo (Figura 20) (39).

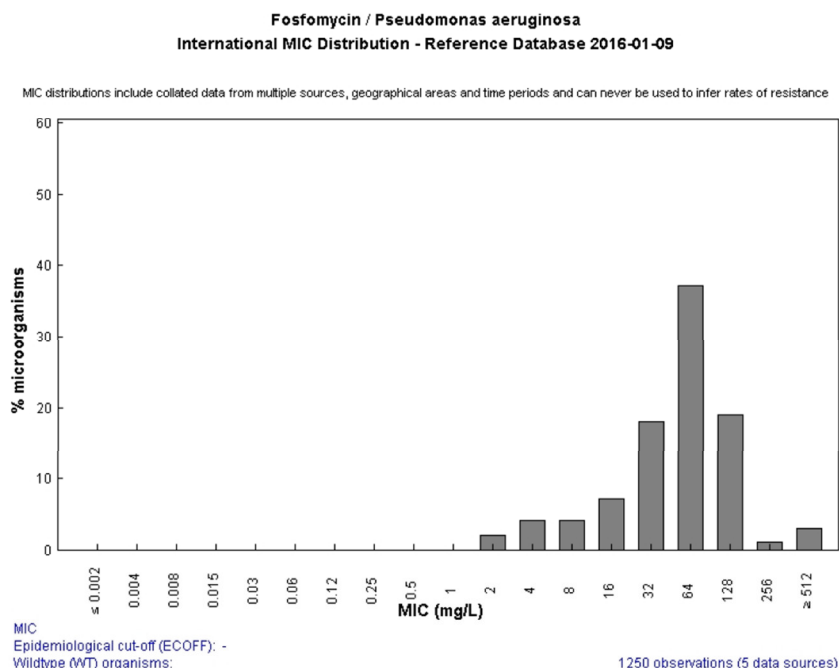


Figura 20: Distribución de CMI de fosfomicina para *P. aeruginosa* obtenida de la base de datos de EUCAST (www.eucast.org).

Adoptando el punto de corte epidemiológico de EUCAST de 128 mg/l, el 86.4% de los aislados fueron sensibles cuando se realizó el método de dilución en agar y el 80.6% con la microdilución. Un 13.6% se clasificaron como resistentes con la dilución en agar y un 19.4% con la microdilución. Con ambos métodos se obtuvo una CMI modal de 64 mg/l.

Respecto a los valores de CMI poblacionales, la **CMI₅₀** fue 64 mg/l con ambos métodos, mientras que la **CMI₉₀** fue 256 mg/l con el método de dilución en agar y 512 mg/l con la microdilución. La CMI para la cepa control de *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue de 4 mg/l con ambos métodos.

A la hora de determinar la concordancia entre métodos y tomando como referencia el método de dilución en agar, se obtuvo un valor de **acuerdo esencial** del 84% y de **acuerdo de categoría** del 89.3%.

El **valor kappa** fue de 0.65 que se clasifica como “acuerdo sustancial”. Las tasa de **errores muy graves** fue de 17.9% y de 9.6% para los **errores graves** (Tabla 5). Aunque el valor obtenido de errores muy graves fue del 17.9% (5/28), hay que tener en cuenta que el número total de aislados resistentes obtenidos por el método de la dilución en agar es menor que el establecido en las guías (n=30)(87). Además, 3 de estos 5 aislados contribuyeron al acuerdo esencial y variaron únicamente 2 diluciones con respecto a la CMI obtenida con el método de referencia.

	Microdilución		Etest	
	Porcentaje (n/total)	95% IC	Porcentaje (n/total)	95% IC
Acuerdo esencial	84.0 (173/206)	78.2-88.7	65.5 (135/206)	58.6-72.0
Acuerdo de categoría	89.3 (184/206)	84.3-93.2	73.3 (151/206)	66.7-79.2
Errores graves ^a	9.6 (17/178)	5.7-14.9	26.4 (47/178)	17.3-29.2
Errores muy graves ^b	17.9 (5/28)	6.1-36.9	28.6 (8/28)	13.2-48.7

^a Considerando el número de aislados sensibles

^b Considerando el número de aislados resistentes

Tabla 5: Valores de concordancia entre la dilución en agar (método de referencia) y la microdilución y el Etest. IC= Intervalo de confianza

Usando el **test de Wilcoxon** no se encontraron diferencias entre los valores de CMI obtenidos con ambos métodos (P= 0.1327).

Utilizando el **análisis de Bland-Altman (Figura 21)** se observó concordancia entre ambos métodos, ya que la mayoría de los valores se distribuyen dentro del rango de ± 1 dilución de CMI. La línea de tendencia mostró una pendiente negativa (P=0.002), lo que significa que a concentraciones bajas la dilución en agar tiende a dar valores de CMI ligeramente superiores y a concentraciones altas la microdilución fue el método que tuvo valores de CMI más altos.

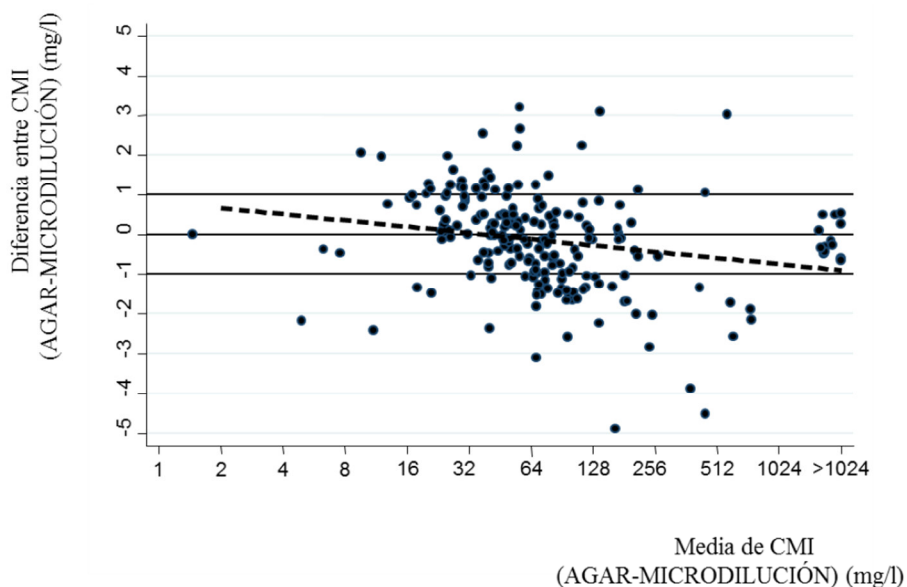


Figura 21: Análisis de Bland-Altman: acuerdo observado representando la diferencia de valores de CMI frente a la media de los valores de CMI obtenidos con los métodos de agar y microdilución. La línea discontinua representa la tendencia de los puntos obtenidos.

A la hora de determinar la sensibilidad a fosfomicina se recomienda la adición al medio de 25 mg/l de glucosa 6-fosfato para aumentar la expresión del transportador UhpT por el que la fosfomicina entra al interior celular. Sin embargo, se ha demostrado que *P. aeruginosa* carece de este transportador, y que por tanto la adición de la glucosa 6-fosfato no está justificada (30).

Por ello, con el objetivo de estudiar el efecto de la adición de este componente en el resultado de sensibilidad, se seleccionaron 25 aislados para determinar la sensibilidad a fosfomicina mediante los métodos de dilución en agar y microdilución sin la adición de glucosa 6-fosfato al medio. Se observaron los mismos valores de CMI con el medio suplementado y no suplementado (**Figura 22**), corroborando el hecho de que *P. aeruginosa* carece del transportador UhpT.

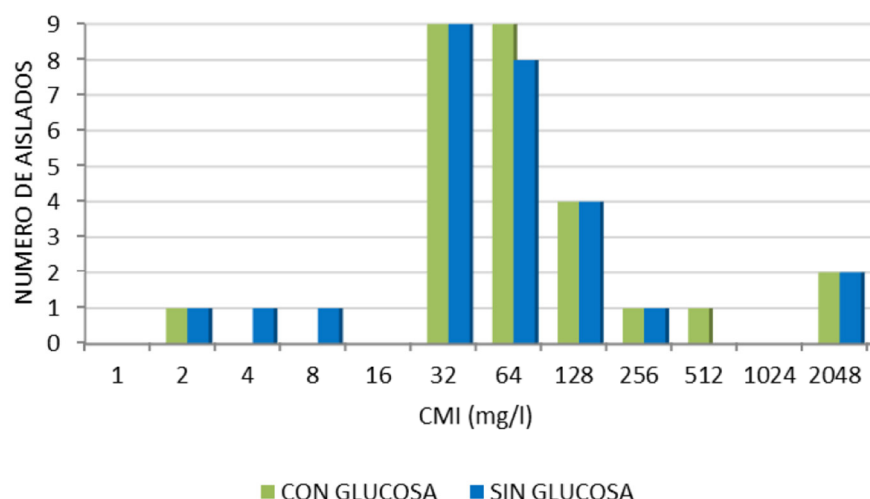


Figura 22: Distribución de la CMI de fosfomicina para *P. aeruginosa* realizado por dilución en agar suplementado con glucosa 6-P (verde) y sin glucosa 6-P (azul)

Los datos de concordancia para los **métodos de difusión** realizados con un inóculo estándar de 0.5 McFarland fueron peores que en el caso de la microdilución. Para las tiras de gradiente de concentraciones se obtuvo una alta tasa de errores graves (26.4%) y de errores muy graves (28.6%) (**Tabla 5**). Se observó que tanto con los discos (independientemente de la carga) como con las tiras de gradiente de concentración, aparecía un alto número de colonias en el interior del halo de inhibición, que en muchos casos dificultaba la lectura de la CMI. En el caso de los discos, estas colonias aparecían frecuentemente y distorsionaban completamente el halo de inhibición imposibilitando la medición del diámetro en un gran número de cepas.

3.2-Validación de un inóculo alternativo para determinar la sensibilidad de *P. aeruginosa* a fosfomicina con los métodos de difusión (tiras de gradiente de concentraciones y discos) (*Anexo 2*).

Ante la baja concordancia entre los resultados obtenidos con los métodos de difusión en el estudio anterior, se planteó la realización de estos métodos con un inóculo bacteriano de menor concentración. El objetivo era disminuir la aparición de colonias mutantes en el interior de los halos de inhibición y facilitar la lectura y con ello, conseguir mejores resultados de concordancia con el método de la dilución en agar.

En este estudio se compararon las CMIs de fosfomicina determinadas por el método de dilución en agar (sin suplementar con glucosa 6-fosfato), con las CMIs obtenidas con los de

Etest y los discos (50 µg), realizadas con dos concentraciones de inóculo diferentes: 1.5×10^8 UFC/ml (0.5 McFarland) y 1.5×10^6 UFC/ml (considerado como inóculo alternativo).

La elección de este inóculo alternativo se basó en los resultados obtenidos con 5 aislados seleccionados, para los que se realizaron los Etest y los discos con un rango de concentraciones de inóculo desde 10^4 UFC/ml hasta 6×10^8 UFC/ml (2 McFarland). Se observó que con inóculos bajos ($<10^6$ UFC/ml) el crecimiento no era confluyente, mientras que con inóculos altos ($>10^6$ UFC/ml) aparecían colonias en el interior de los halos de inhibición dificultando la lectura de la CMI. Por ello, se eligió la concentración de 10^6 UFC/ml como inóculo alternativo (**Figura 23**) y fue éste el que se utilizó para realizar el estudio.

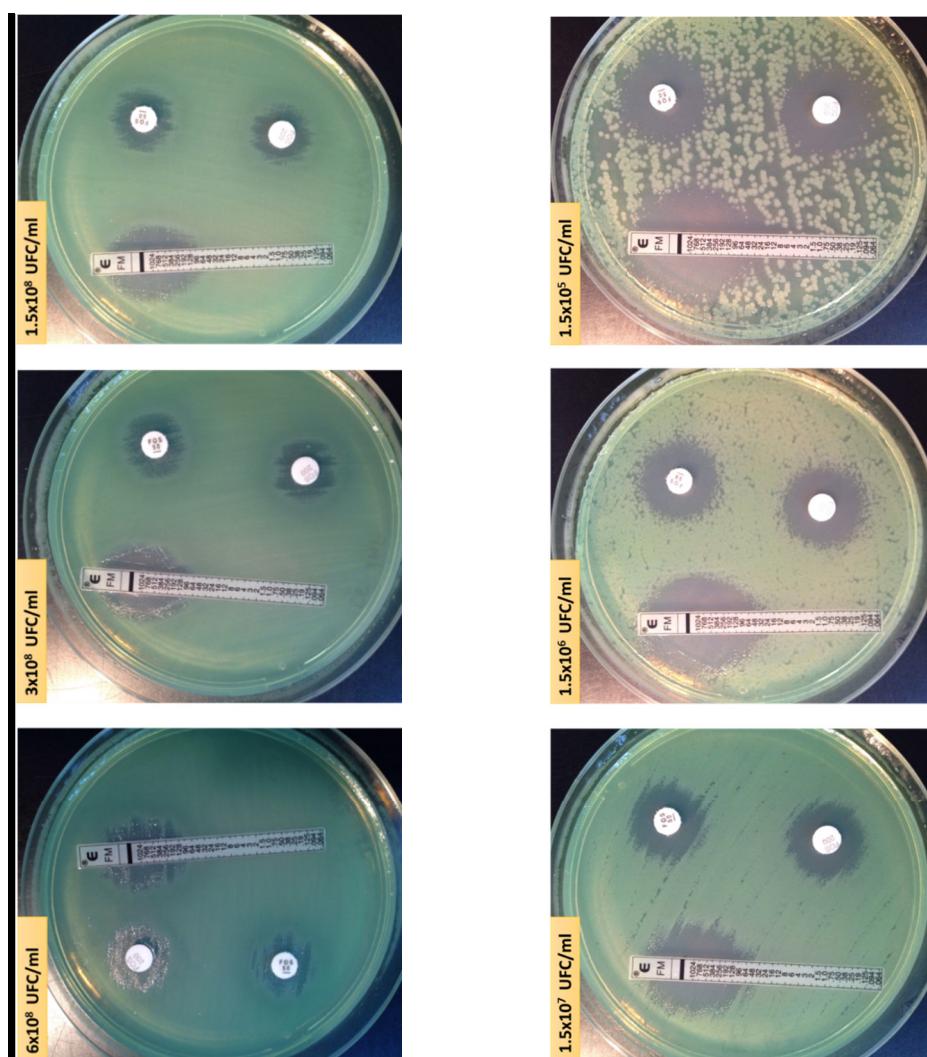


Figura 23: Ejemplo de una cepa (n55, CMI en agar=64 mg/l) con la que se determinó el efecto que tenía el uso de distintos inóculos a la hora de determinar la sensibilidad a fosfomicina por Etest y por discos. Se puede observar que a inóculos $>10^6$ UFC/ml los halos de inhibición no son definidos, debido a las colonias que aparecen en el interior, mientras que a concentraciones $<10^6$ UFC/ml el crecimiento no era confluyente.

Respecto a los resultados de concordancia obtenidos por Etest y considerando la dilución en agar como método de referencia, el **acuerdo esencial** fue de 93.6% para las CMI obtenidas con el inóculo de 10^6 UFC/ml y 67.7% para el inóculo estándar de 0.5 McFarland. El **acuerdo de categoría** fue del 95% utilizando 10^6 UFC/ml y del 78.2% para el inóculo de 10^8 UFC/ml. En cuanto a la tasa de **errores graves**, se obtuvo un valor más alto para el inóculo estándar (22.2%) respecto al resultante con el inóculo alternativo (1.5%). Sin embargo la tasa de **errores muy graves** fue de 31.2% (5/16) para el inóculo alternativo y de 18.7% para el inóculo estándar. Los valores del **índice kappa** fueron de 0.73 para el inóculo alternativo que se clasifica como una buena fuerza de concordancia y de 0.35 para el inóculo estándar que se traduce en una fuerza de concordancia débil. El **coeficiente de correlación intraclase** fue de 0.88 para el inóculo estándar y de 0.68 para el inóculo alternativo, que se traduce como fiabilidad excelente y fiabilidad regular-buena, respectivamente (**Tabla 6**).

	Etest- 10^6 UFC/ml		Etest- 10^8 UFC/ml	
	Porcentaje	95% IC	Porcentaje	95% IC
Acuerdo esencial	93.6	88.3-97	67.6	59.2-75.2
Acuerdo de categoría	95	90.1-98	78.2	70.5-84.6
Errores graves ^a	1.5	0.2-5.6	22.2	15.3-30.5
Errores muy graves ^b	31.2	11-58.6	18.7	4-45.6
CCI^c	0.88	0.82-0.92	0.68	0.56-0.78
Kappa	0.73	-	0.35	-

Tabla 6: Correlación entre el Etest realizado con un inóculo de 10^6 UFC/ml y 10^8 UFC/ml con la dilución en agar. *a-Considerando el número de aislados sensibles b-Considerando el número de aislados resistentes c-Coeficiente de correlación intraclase*

El único valor discrepante para el inóculo alternativo fue la tasa de errores muy graves, por lo que se profundizó en el estudio de este dato. De las 16 cepas resistentes por la dilución en agar, 5 de ellas fueron sensibles con el Etest utilizando el inóculo alternativo, con un valor de CMI para todas ellas en el límite del ECOFF (128 mg/l). En estos 5 aislados se amplificó y secuenció el gen *gltP* y no se encontraron mutaciones codificantes en ninguna secuencia de estas cepas. Este hecho apoya la teoría de que estos aislados pertenecen a la población salvaje

y que esta discrepancia podría deberse a la presencia de mecanismos de resistencia “en el límite” o *borderline* desconocidos.

Mediante el **análisis de Bland-Altman**, se obtuvo un alto nivel de concordancia con el inóculo alternativo ya que la mayoría de los valores se distribuyeron dentro del rango de ± 1 dilución (acuerdo esencial). La línea de tendencia presentó una ligera tendencia negativa pero también dentro del rango de ± 1 dilución. Sin embargo, se observó que con el inóculo estándar los puntos se distribuyeron en un amplio rango de valores y la línea de tendencia presentó una marcada pendiente negativa. Esto se traduce en que a altas concentraciones de fosfomicina el Etest realizado con el inóculo de 10^8 UFC/ml presentó CMI's más altas que la dilución en agar, superando el límite -1 (**Figura 24**).

La asociación lineal entre el diámetro de inhibición de los discos realizados con los dos inóculos y las CMI's determinadas con el método de dilución en agar fueron establecidas mediante gráficas de regresión lineal (**Figura 25**) y se calculó el coeficiente de Spearman que fue de -0.81 para el inóculo alternativo y de -0.71 para el inóculo estándar.

En general, tanto con los discos como con los Etest, los halos de inhibición fueron mucho más definidos cuando se utilizó el inóculo alternativo, evitando colonias mutantes que dificultaban la lectura con el inóculo estándar (**Figura 26**). Este hecho podría explicar la mejor concordancia obtenida con esta concentración de inóculo.

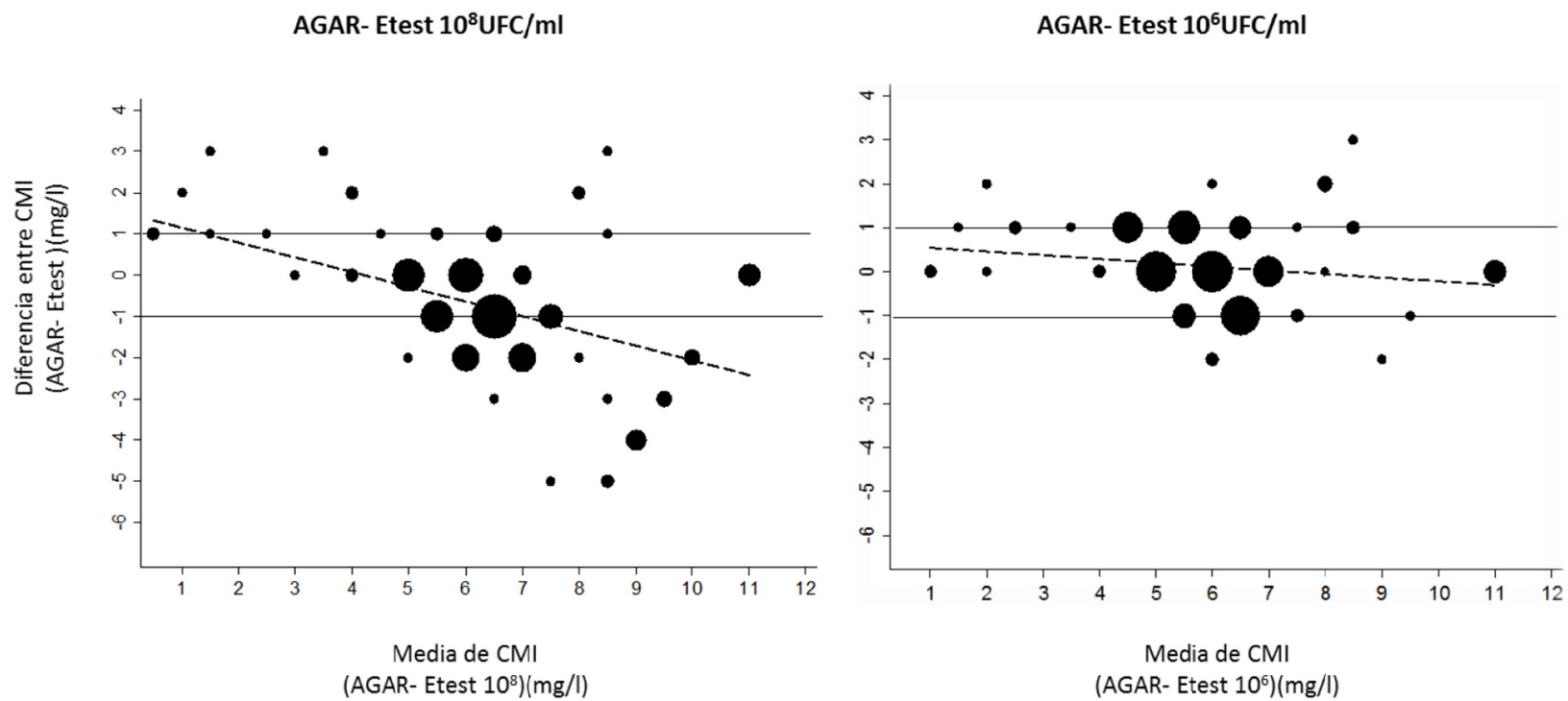


Figura 24

Análisis gráfico de Bland-Altman: concordancia entre la dilución en agar y el Etest realizado con dos concentraciones de inóculo: 10⁸ UFC/ml y 10⁶ UFC/ml

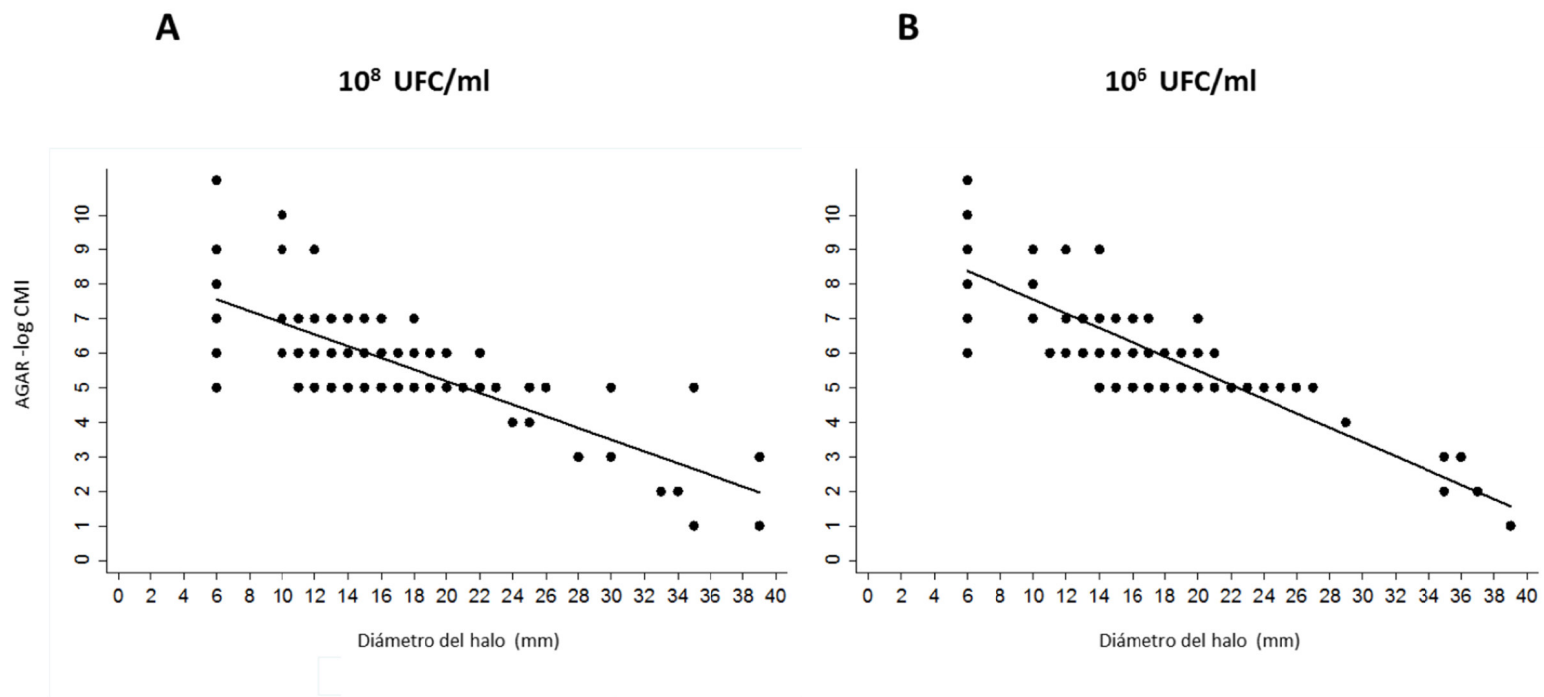


Figura 25

Gráficas de regresión que demuestran la asociación lineal entre las CMI obtenidas con la dilución en agar y el diámetro del halo de inhibición (mm) resultante de los discos realizados con un inóculo de 10^8 UFC/ml (A) y 10^6 UFC/ml (B).

A

B

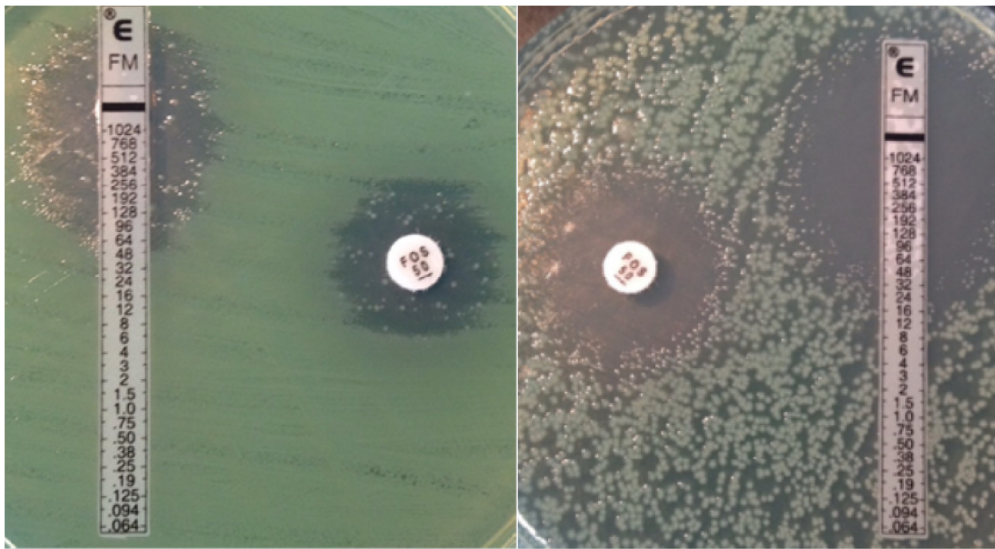


Figura 26: Etest y difusión con discos de fosfomicina realizados con un inóculo de 10^8 UFC/ml (A) y 10^6 UFC/ml (B) en una cepa para la que la CMI en agar fue de 64 mg/l. CMI Etest A = 96-1024 mg/l. CMI Etest B= 32-48 mg/l

3.3-Efecto del medio utilizado para determinar la CMI a fosfomicina en *P. aeruginosa*

3.3.1-CÁLCULO DE LA CMI EN AGAR NUTRITIVO.

Según los estándares del comité CLSI, para determinar la sensibilidad a cualquier antimicrobiano el medio a utilizar debe ser Muller-Hinton, tanto en los métodos de dilución en agar como en los de dilución en medio líquido. Este medio ha demostrado buena reproducibilidad y permite un crecimiento satisfactorio para la mayoría de las bacterias. Así mismo, existe una amplia experiencia y datos registrados sobre el uso de este medio para la determinación de la sensibilidad antibiótica. Sin embargo, se sabe que la actividad de fosfomicina en Muller-Hinton disminuye (41). De hecho, determinados grupos como el Comité Japonés del Antibiograma recomienda en sus guías el uso de agar nutritivo para la determinación de la sensibilidad a la fosfomicina (90).

Para determinar la influencia del medio en la sensibilidad a fosfomicina se calcularon las CMIs de fosfomicina mediante dilución en agar empleando Muller-Hinton y agar nutritivo (Difco) en 28 cepas de *P. aeruginosa* seleccionadas del estudio anterior. Los resultados se pueden observar en la **Figura 27**, donde se aprecia una disminución de los valores de CMI cuando se utilizó el agar nutritivo. La CMI₅₀, cuando se empleó el medio de Muller-Hinton, fue de 64 mg/l, mientras que cuando se utilizó el agar nutritivo fue de 4 mg/l.

Estos resultados se corresponden con los de trabajos publicados anteriormente (91,92). La diferencia en la actividad de la fosfomicina según el medio utilizado podría ser debida a la diferente composición de los mismos, ya que el medio Muller-Hinton contiene caseína que es un compuesto rico en fosfatos. Una alta cantidad de fosfato en el medio extracelular inhibe el transporte de glicerol 3-P y consecuentemente el de fosfomicina al interior de la bacteria.

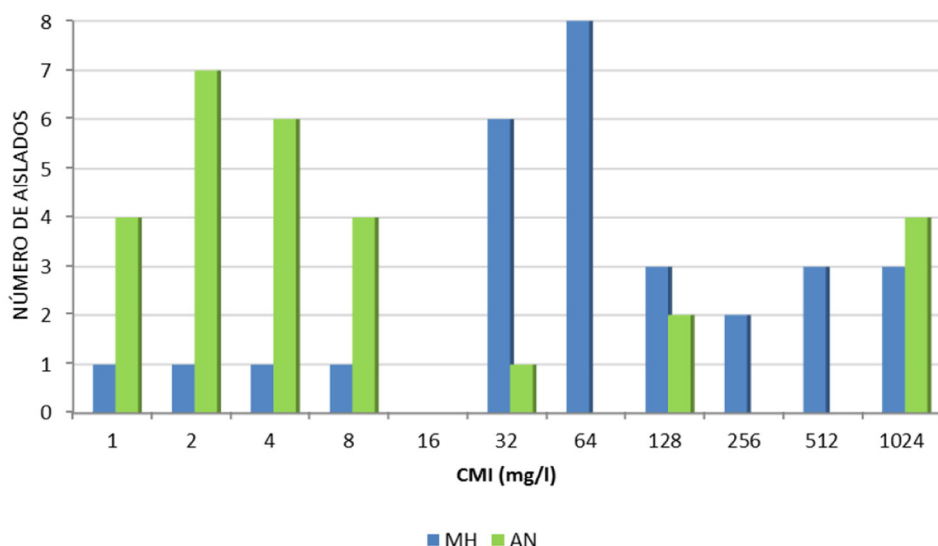


Figura 27: Distribución de las CMIs de fosfomicina determinadas con agar Muller-Hinton (MH) y con agar nutritivo (AN).

3.4-CÁLCULO DE LA CMI EN MULLER-HINTON SUPLEMENTADO CON GLICEROL.

El transportador GlpT mantiene una actividad basal sin inductores y además se puede inducir por sustancias como el glicerol y el glicerol 3-P. Se ha observado que cuando se añade **glicerol al medio** (10mM), la concentración de fosfomicina intracelular aumenta ligeramente, por la inducción del transportador GlpT (36). Para bacterias que carecen del transportador UhpT, la adición al medio de glucosa 6-P no está justificada, sin embargo, no se ha determinado el efecto que tendría la adición al medio de glicerol en la sensibilidad a fosfomicina en estos casos.

Con el objetivo de determinar el posible efecto que el glicerol tiene en el resultado de la CMI de fosfomicina en *P. aeruginosa*, se estudiaron 9 cepas y se realizó la técnica de Etest con un inóculo 0.5 McFarland en medio Muller-Hinton suplementado con glicerol a una concentración final de 10 mM (36) y 0.1mM, siendo esta última la concentración de glicerol que hay en el plasma humano (93).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 28**. Para alguna de estas cepas (3/9), la CMI disminuyó cuando el Etest se realizó en medio suplementado con glicerol (disminución de 2-5 diluciones). Este resultado confirma que la inducción con glicerol puede aumentar la concentración de fosfomicina intracelular, aunque este efecto parece ser dependiente de la cepa.

Si bien la concentración de glicerol utilizada no parece influir en los resultados de la CMI, los halos de inhibición fueron más definidos con 10mM de glicerol (**Figura 29**).

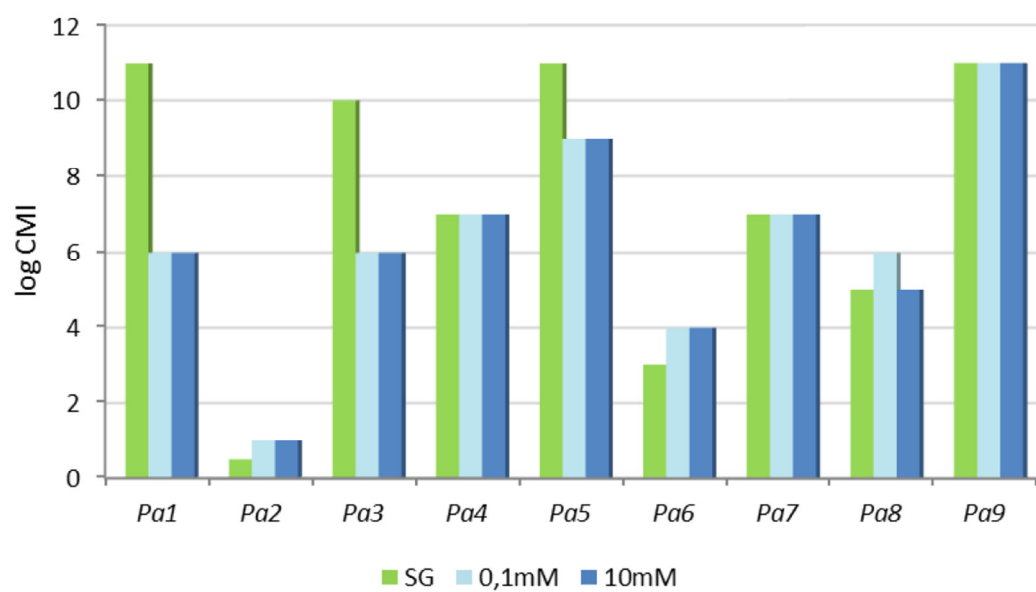


Figura 28: Valores de CMIs obtenidos por Etest para las diferentes cepas (Pa1-Pa9) utilizando Muller-Hinton sin glicerol (SG) y Muller-Hinton suplementado con 0.1mM y 10 mM de glicerol.

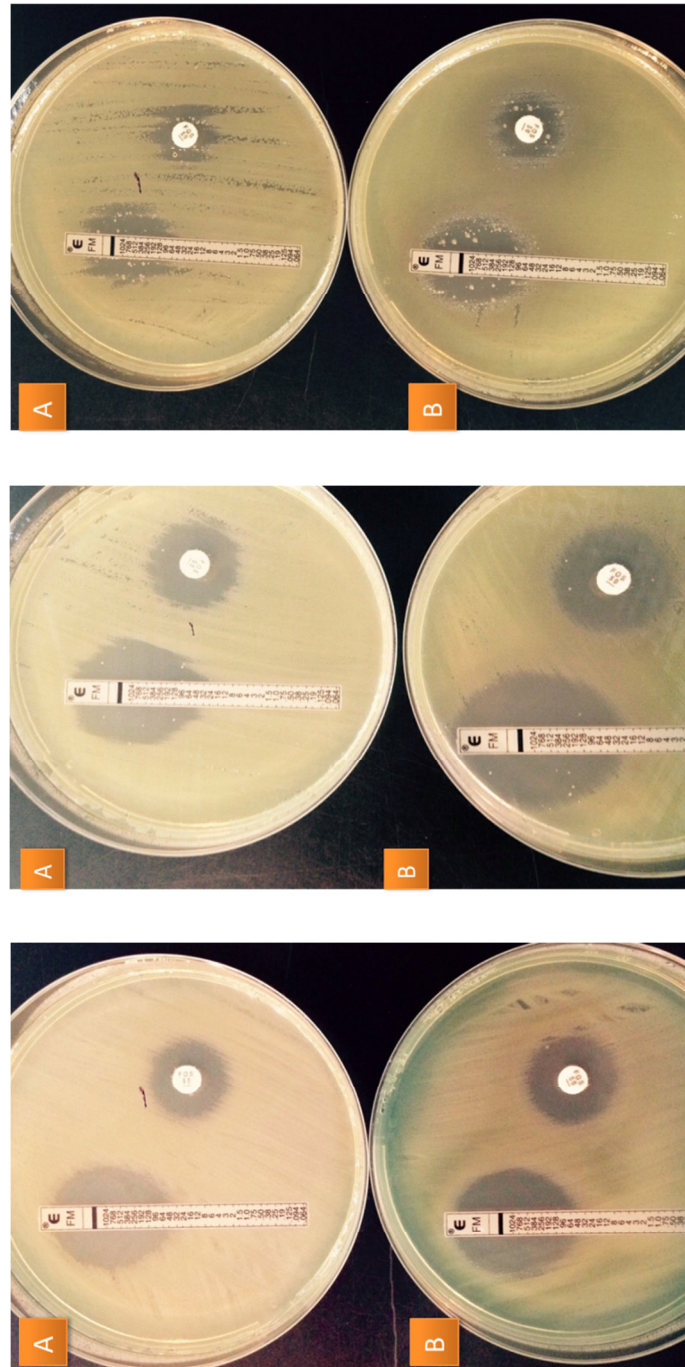


Figura 29: Ejemplo de 3 cepas de *P. aeruginosa* en las que se puede observar la diferencia de elipses y halos de inhibición obtenidos utilizando medio Muller-Hinton suplementado con 0.1mM (A) o 10mM (B) de glicerol.

4-Discusión

En la era de la multirresistencia bacteriana a los antibióticos, la fosfomicina utilizada en combinación con otros antibióticos se presenta como una alternativa para el tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. El interés por este antibiótico se ha incrementado en los últimos años, sin embargo, al no constituir una primera línea de tratamiento frente a *P. aeruginosa*, el conocimiento clínico y microbiológico sobre su actividad en este caso es aún limitado (94).

Por ello, en este primer capítulo se ha comprobado la actividad *in vitro* de la fosfomicina frente a este microorganismo, y se han establecido las condiciones a utilizar a la hora de determinar la sensibilidad *in vitro*.

Se ha analizado la **actividad de fosfomicina** en dos grupos de aislados de *P. aeruginosa*, sensibles y resistentes a carbapenémicos y se ha demostrado que la distribución de CMIs es similar en ambos grupos ($\text{CMI}_{50}=64 \text{ mg/l}$, $\text{CMI}_{90}=128\text{-}256 \text{ mg/l}$), lo que confirma que la fosfomicina no presenta resistencia cruzada con estos antibióticos. Esto hace que en muchos casos, fosfomicina sea una de las pocas opciones terapéuticas posibles para el tratamiento de microorganismos multirresistentes, particularmente aquellos productores de carbapenemasas. Recientemente se ha realizado un estudio en la India, país donde no está comercializada la fosfomicina, determinando la actividad de este antibiótico frente a *P. aeruginosa* y se han obtenido prácticamente las mismas CMIs poblacionales que en nuestro estudio ($\text{CMI}_{50}=32 \text{ mg/l}$ y $\text{CMI}_{90}=256 \text{ mg/l}$) (95). Esto podría indicar que, a pesar de que en los últimos años se ha estado utilizando este antibiótico para tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, la terapia combinada evita la aparición de resistencias y su actividad se mantiene inalterada, como en los países que nunca han utilizado este compuesto.

Los métodos de microdilución automática y los métodos de difusión (tiras de gradiente de concentraciones y discos) son utilizados globalmente en los laboratorios clínicos para la determinación de la sensibilidad antibiótica. En el caso de la determinación de la sensibilidad a fosfomicina en *P. aeruginosa*, el método de referencia es la dilución en agar, método que muy raramente se utiliza en la rutina diaria. Por ello, el objetivo de nuestro trabajo fue ver la **correspondencia entre todas estas técnicas**. Para ello, además del cálculo del acuerdo esencial, acuerdo de categoría y tasa de errores, se tuvieron en cuenta otros parámetros estadísticos como el análisis de Bland-Altman. Con el conjunto de todos los datos y con el análisis de errores obtenidos se pudo decidir si los métodos se podían considerar concordantes o no.

En nuestro trabajo se ha observado una buena correlación entre la microdilución y la dilución en agar, lo que permite el empleo de la microdilución para la determinación de la sensibilidad a fosfomicina en cepas de *P. aeruginosa* con total validez. Sin embargo, los Etest y los discos realizados con un inóculo de 0.5 McFarland, no son métodos fiables para determinar la sensibilidad de *Pseudomonas* a este antibiótico. Este hecho también se ha observado en otros estudios llevados a cabo con otros microorganismos como *K. pneumoniae* y fosfomicina (96,97).

La estandarización del **inóculo** de 0.5 McFarland para realizar los métodos de difusión se validó hace años y se considera un dogma a seguir con todos los microorganismos y antibióticos (98,99). Sin embargo, hemos demostrado que la concentración de inóculo a utilizar no debe establecerse como un valor inalterable en todos los casos.

Se sabe que la cepa salvaje de *P. aeruginosa* (PA14) posee una frecuencia de mutación para fosfomicina de 10^{-6} (30). El inóculo final usado en la microdilución y en la dilución en agar es de 10^4 UFC por pocillo y por impronta, respectivamente. Sin embargo, cuando se utilizan los métodos de difusión se prepara una suspensión inicial de 10^8 UFC/ml y se inoculan 10^6 UFC en la placa de Muller-Hinton, ya que el volumen absorbido en la torunda es aproximadamente de 25 μ l (100). Esto hace que se incluyan subpoblaciones resistentes dentro del inóculo, lo que determina la aparición de colonias mutantes en el interior de los halos. Estas colonias dificultan en muchos casos la medida del halo de inhibición, ya que los bordes no son definidos y hacen que los resultados no sean reproducibles. El uso de 10^6 UFC/ml como inóculo alternativo en los métodos de difusión mejora la concordancia con el método de referencia, creando bordes definidos y disminuyendo la aparición de colonias en el interior de los halos, permitiendo así una lectura clara de la CMI o del diámetro producido por los discos.

La validación de este **inóculo alternativo** para determinar la sensibilidad de *P. aeruginosa* a fosfomicina permitiría su uso en los laboratorios clínicos obteniendo resultados más precisos y fiables. Desde el punto de vista de la utilidad clínica del resultado informado, este inóculo permitiría evitar la aparición de las subpoblaciones mutantes y por tanto comunicar la CMI de la población mayoritaria, puesto que fosfomicina se da en terapia combinada y se ha demostrado que de esta manera se previene la aparición de mutantes resistentes (101).

Hay que clarificar que el estudio se realizó con una colección de cepas clínicas que no procedían de pacientes con fibrosis quística. En el caso de *P. aeruginosa* aisladas de fibrosis quística, por las características especiales de este tipo de cepas, se recomienda utilizar la dilución en agar o los métodos de difusión con la metodología específica para este tipo de aislados (102).

La influencia del inóculo en los resultados de sensibilidad fue observada en estudios anteriores (41,46). En el trabajo de Greenwood *et al.* se observó que algunas cepas experimentaban un incremento de 4 veces en el valor de la CMI cuando se aumentaba el inóculo de 10^3 UFC a 10^5 UFC/por impronta. Este efecto también se ha observado *in vivo* en ratones, donde la dosis efectiva 50 de fosfomicina disminuía en paralelo con el inóculo de *P. aeruginosa* administrado (90), lo que recalca la importancia del tipo de infección a tratar en términos de inóculo, y la necesidad de la terapia combinada a la hora de utilizar este antibiótico.

Por otra parte se ha demostrado que hay otros factores, además del inóculo, que pueden influir en el resultado de la sensibilidad, como por ejemplo el tipo de medio empleado.

El efecto que el **tipo de medio** utilizado tenía en la sensibilidad *in vitro* se observó en los primeros años tras el descubrimiento de la fosfomicina. Así, se ha demostrado una actividad casi nula de este antibiótico en medio con alta concentración de glucosa y fosfatos, como serían el medio Muller-Hinton y el medio Iso-sensitest, ya que ambos compuestos son inhibidores del transporte de fosfomicina. En varios estudios se cita el agar nutritivo como el medio óptimo para determinar la sensibilidad a fosfomicina (35,46,90), sin embargo, para la estandarización de las técnicas de sensibilidad se eligió el medio Muller-Hinton para establecer la actividad de los antibióticos *in vitro* (103). En nuestro trabajo se corrobora este hecho, observando una distribución de CMIs desplazada a la izquierda cuando se utilizó agar nutritivo comparada con la distribución de CMI determinada en agar Muller-Hinton. Esta diferencia es consecuencia de la distinta composición de los medios, ya que el medio Muller-Hinton contiene alta concentración de fosfatos (35) que inhibirían el transporte de la fosfomicina al interior celular.

Por otra parte, se ha demostrado que el glicerol actúa como inductor del transportador GlpT, disminuyendo la CMI según la cepa cuando es añadido al medio. Este efecto ya fue observado por Kahan *et al.* quienes demostraron que en presencia de glicerol se inducía la expresión de *glpT* y la concentración de fosfomicina aumentaba en el interior celular en torno al doble (36). Sin embargo, en bacterias que poseen el transportador UhpT (como *E. coli*), la inducción con glucosa 6-P hace aumentar la concentración de fosfomicina 5 veces en el interior celular, por lo que UhpT actuaría como transportador principal cuando el inductor está presente. Por ello, para la determinación de sensibilidad en estos casos se recomienda utilizar el medio suplementado con glucosa 6-P.

Hasta hace poco tiempo se había asumido que *P. aeruginosa* presentaba ambos transportadores y que para la determinación de la sensibilidad también se necesitaba incluir este compuesto en el medio. Sin embargo Blázquez *et al.* demostraron que GlpT es el único

transportador de fosfomicina en *P. aeruginosa* (30). La ausencia de UhpT en *P. aeruginosa* se manifestó al no observar crecimiento ni de la cepa control de PA14 ni de sus mutantes isogénicos en el medio con glucosa 6-P como única fuente de carbono. En nuestro estudio se demostró que la adición de glucosa 6-P recomendada por CLSI para la determinación de sensibilidad a fosfomicina no es necesaria en *P. aeruginosa*, así las CMI's para 25 aislados fue similar cuando se determinaron con medio con o sin glucosa 6-P en el medio.

Estas variaciones en los resultados de sensibilidad obtenidos según las condiciones utilizadas recalcan la importancia de definir claramente las condiciones para la determinación de la CMI, teniendo en cuenta las características del antibiótico y el microorganismo individualmente. El objetivo que se pretende es que el resultado *in vitro* se asemeje lo máximo posible a lo que sucede tras la administración del fármaco *in vivo* y de este modo poder proporcionar resultados de sensibilidad precisos y reproducibles.

Existen varios ejemplos en los que las condiciones de ensayo varían según el antibiótico utilizado, como es el caso de la adición de ClNa al 2% para la oxacilina en *Staphylococcus* spp., el agregado de 50 mg/l de calcio cuando se determina la sensibilidad a daptomicina, o el añadido de P-80 para los nuevos lipoglucopeptidos. Tras los resultados obtenidos en este trabajo se propone que el inóculo utilizado se considere como un factor más a tener en cuenta, particularmente cuando la tasa de mutación para el antibiótico en estudio sea cercana a la concentración del inóculo empleado.



In Vitro Activity of Fosfomycin against a Collection of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from 16 Spanish Hospitals: Establishing the Validity of Standard Broth Microdilution as Susceptibility Testing Method

María Díez-Aguilar,^a María-Isabel Morosini,^{a,b} Rosa del Campo,^{a,b} María García-Castillo,^{a,b} Javier Zamora,^{b,c} Rafael Cantón^{a,b}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^a; CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain^b; Unidad de Bioestadística Clínica Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^c

The broth microdilution method for fosfomycin and *Pseudomonas aeruginosa* was assessed and compared with the approved agar dilution method in 206 genetically unrelated *P. aeruginosa* clinical isolates. Essential agreement between the two methods was 84%, and categorical agreement was 89.3%. Additionally, Etest and disk diffusion assays were performed. Results validate broth microdilution as a reliable susceptibility testing method for fosfomycin against *P. aeruginosa*. Conversely, unacceptable concordance was established between Etest and disk diffusion results with agar dilution results.

Multi-drug resistance (MDR) in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates has been widely reported and is of particularly concern in severe infections for which few therapeutic options remain available (1). Fosfomycin shows no cross-resistance with other antimicrobials and has demonstrated safety and efficacy over a broad range of infections and organisms (2). This antibiotic may act synergistically with many antimicrobials, and the intravenous form could be administered in combination for the treatment of systemic infections caused by MDR *P. aeruginosa*.

The approved *in vitro* antimicrobial susceptibility testing method for fosfomycin is agar dilution (5); however, broth microdilution is the basis of automated systems currently used in clinical microbiology laboratories. Neither the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (5) nor the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (6) includes fosfomycin breakpoints for *P. aeruginosa*, although EUCAST has defined an epidemiological cutoff (ECOFF) value (6).

Our study was designed to evaluate the *in vitro* fosfomycin activity against a collection of *P. aeruginosa* isolates by standard broth microdilution and to compare that method's performance with the performance of agar dilution, considered in this study as the reference method. In addition, agar dilution and broth microdilution were also assessed without glucose-6-phosphate (G6P) against 25 strains exhibiting different fosfomycin MIC values. Etest and disk diffusion were also assessed. A total of 206 genetically unrelated clinical *P. aeruginosa* isolates, 148 carbapenem susceptible and 58 non-carbapenem susceptible, were included (7). *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as the control.

(Part of this research was presented at the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, United Kingdom, 31 March to 3 April 2012.)

Susceptibility to fosfomycin (Laboratorios Ern, S.A., Barcelona, Spain) was determined concomitantly by agar dilution and broth microdilution using BBL Mueller-Hinton II cation-adjusted agar and broth, respectively (Becton, Dickinson [BD], Sparks, MD), both supplemented with 25 µg/ml of G6P (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). The MIC was defined as the lowest antibiotic concentration that inhibited visible growth of

the organism. MIC interpretation was done using an ECOFF value of ≤ 128 µg.

Fosfomycin disk diffusion using disks of two different strengths (200 µg [BD] and 50 µg [Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom]), both supplemented with 50 µg of G6P (5, 8), and the Etest (containing 25 µg/ml of G6P; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) were performed in duplicate on the same day. Isolates showing colonies inside both the inhibition ellipse of the Etest and the inhibition zone diameters of disks but excluding an objective measurement were recorded as "resistant." Quantification, susceptibility status, and mutation rate of these colonies were not assessed, as this appraisal was beyond the scope of the present work.

Categorical error rates (categorical agreement [CA]) were calculated after comparing the MICs obtained by microdilution and Etest with those obtained by the agar dilution method. Essential agreement (EA) was defined as when the MIC results obtained by the two methods were identical or agreed within approximately one 2-fold dilution. Major and very major errors were recorded according to published guidelines (9). Error levels were computed as percentages along with their corresponding exact 95% confidence intervals (10). The log₂-transformed MICs obtained by the different procedures were compared using a nonparametrical test (Wilcoxon rank sum test), and statistical significance was established at a *P* value of <0.05 . Agreement between procedures was assessed by following the Bland and Altman method (11). Briefly, the mean MIC values obtained with the two methods were plotted (*x* axis) against the difference between such MIC values (*y* axis). A linear model, to test the presence of any linear trend between the

Received 25 March 2013 Returned for modification 1 July 2013

Accepted 3 August 2013

Published ahead of print 12 August 2013

Address correspondence to María-Isabel Morosini, mariaisabel.morosini@salud.madrid.org.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00589-13

In Vitro Activity of Fosfomycin against a Collection of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from 16 Spanish Hospitals: Establishing the Validity of Standard Broth Microdilution as Susceptibility Testing Method

María Díez-Aguilar,^a María-Isabel Morosini,^{a,b} Rosa del Campo,^{a,b} María García-Castillo,^{a,b} Javier Zamora,^{b,c} Rafael Cantón^{a,b}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^a; CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain^b; Unidad de Bioestadística Clínica Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^c

The broth microdilution method for fosfomycin and *Pseudomonas aeruginosa* was assessed and compared with the approved agar dilution method in 206 genetically unrelated *P. aeruginosa* clinical isolates. Essential agreement between the two methods was 84%, and categorical agreement was 89.3%. Additionally, Etest and disk diffusion assays were performed. Results validate broth microdilution as a reliable susceptibility testing method for fosfomycin against *P. aeruginosa*. Conversely, unacceptable concordance was established between Etest and disk diffusion results with agar dilution results.

Multi-drug resistance (MDR) in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates has been widely reported and is of particularly concern in severe infections for which few therapeutic options remain available (1). Fosfomycin shows no cross-resistance with other antimicrobials and has demonstrated safety and efficacy over a broad range of infections and organisms (2). This antibiotic may act synergistically with many antimicrobials, and the intravenous form could be administered in combination for the treatment of systemic infections caused by MDR *P. aeruginosa* (3, 4).

The approved *in vitro* antimicrobial susceptibility testing method for fosfomycin is agar dilution (5); however, broth microdilution is the basis of automated systems currently used in clinical microbiology laboratories. Neither the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (5) nor the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (6) includes fosfomycin breakpoints for *P. aeruginosa*, although EUCAST has defined an epidemiological cutoff (ECOFF) value (6).

Our study was designed to evaluate the *in vitro* fosfomycin activity against a collection of *P. aeruginosa* isolates by standard broth microdilution and to compare that method's performance with the performance of agar dilution, considered in this study as the reference method. In addition, agar dilution and broth microdilution were also assessed without glucose-6-phosphate (G6P) against 25 strains exhibiting different fosfomycin MIC values. Etest and disk diffusion were also assessed. A total of 206 genetically unrelated clinical *P. aeruginosa* isolates, 148 carbapenem susceptible and 58 non-carbapenem susceptible, were included (7). *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as the control.

(Part of this research was presented at the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, United Kingdom, 31 March to 3 April 2012.)

Susceptibility to fosfomycin (Laboratorios Ern, S.A., Barcelona, Spain) was determined concomitantly by agar dilution and broth microdilution using BBL Mueller-Hinton II cation-adjusted agar and broth, respectively (Becton, Dickinson [BD], Sparks, MD), both supplemented with 25 µg/ml of G6P (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). The MIC was defined as the lowest antibiotic concentration that inhibited visible growth of

the organism. MIC interpretation was done using an ECOFF value of ≤128 µg/ml (6). Fosfomycin disk diffusion using disks of two different strengths (200 µg [BD] and 50 µg [Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom]), both supplemented with 50 µg of G6P (5, 8), and the Etest (containing 25 µg/ml of G6P; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) were performed in duplicate on the same day. Isolates showing colonies inside both the inhibition ellipse of the Etest and the inhibition zone diameters of disks but excluding an objective measurement were recorded as "resistant." Quantification, susceptibility status, and mutation rate of these colonies were not assessed, as this appraisal was beyond the scope of the present work.

Categorical error rates (categorical agreement [CA]) were calculated after comparing the MICs obtained by microdilution and Etest with those obtained by the agar dilution method. Essential agreement (EA) was defined as when the MIC results obtained by the two methods were identical or agreed within approximately one 2-fold dilution. Major and very major errors were recorded according to published guidelines (9). Error levels were computed as percentages along with their corresponding exact 95% confidence intervals (10). The log₂-transformed MICs obtained by the different procedures were compared using a nonparametrical test (Wilcoxon rank sum test), and statistical significance was established at a *P* value of <0.05. Agreement between procedures was assessed by following the Bland and Altman method (11). Briefly, the mean MIC values obtained with the two methods were plotted (*x* axis) against the difference between such MIC values (*y* axis). A linear model, to test the presence of any linear trend between the

Received 25 March 2013 Returned for modification 1 July 2013

Accepted 3 August 2013

Published ahead of print 12 August 2013

Address correspondence to María-Isabel Morosini, mariaisabel.morosini@salud.madrid.org.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00589-13



Is a New Standard Needed for Diffusion Methods for *In Vitro* Susceptibility Testing of Fosfomycin against *Pseudomonas aeruginosa*?

María Díez-Aguilar,^{a,b} Laura Martínez-García,^a Rafael Cantón,^{a,b} María Isabel Morosini^{a,b}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^a; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^b

We analyzed fosfomycin susceptibility results in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained by MIC gradient strips and disk diffusion methods using two different inocula, 10⁸ and 10⁶ CFU/ml, and compared them to the agar dilution reference method. Essential and categorical agreements were 93.6% and 95%, respectively, for the 10⁶ CFU/ml alternative inoculum, and they were 67.6% and 78.2%, respectively, for the standard inoculum (10⁸ CFU/ml). The use of the 10⁶ CFU/ml inoculum improves the agreement values and inhibition zone readings.

The increase in antimicrobial resistance has forced researchers to look for new therapeutic strategies to treat infections. Fosfomycin has demonstrated efficacy when combined with other antimicrobials for the treatment of urinary and systemic infections against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* (1). Fosfomycin-calcium and fosfomycin-tromethamine for oral use as well as fosfomycin-disodium for intravenous administration have been extensively used in some European countries and in Japan, while the intravenous formulation is now under clinical evaluation in the United States (2). However, studies documenting the *in vitro* activity of fosfomycin against *P. aeruginosa* remain scarce, and clinical breakpoints have not been established. EUCAST includes an epidemiological cutoff value (ECOFF) of 128 μ g. For *in vitro* susceptibility testing, agar dilution is considered the reference method, but the microdilution method has demonstrated adequate concordance in non-cystic fibrosis *P. aeruginosa* isolates. In contrast, MIC gradient strips and disk diffusion methods, widely used in clinical laboratories, did not demonstrate performance similar to that of the reference method (4).

The objective of our work was to analyze fosfomycin susceptibility testing results obtained when using MIC gradient strips and disk diffusion simultaneously performed with two different inoculum concentrations (10⁸ and 10⁶ CFU/ml) against a collection of 142 genetically unrelated *P. aeruginosa* clinical isolates (5). Molecular changes in the sequence of the *glpT* gene, responsible for coding the sole fosfomycin transporter (GlpT) in this species, were also assessed (6, 7).

P. aeruginosa ATCC 27853 was used as the control strain. Fosfomycin (Laboratorios Ern, Barcelona, Spain) MICs were determined by the reference agar dilution method (BBL Mueller Hinton II cation-adjusted agar; Becton-Dickinson, Sparks, MD), and their values were considered to be the reference (8). Since *P. aeruginosa* lacks the UhpT transport system, the addition of glucose-6-phosphate to the medium was unnecessary (6). MICs were also determined by Etest (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and disk diffusion (50 μ g Oxoid; Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, United Kingdom) methods with two different inocula: (i) a standard 1.5 \times 10⁸ CFU/ml inoculum (0.5 McFarland standard) and (ii) a 1:100 dilution (1.5 \times 10⁶ CFU/ml) of the standard suspension, which has been considered an alternative inoculum. This bacterial load was selected based on the results obtained in 5

isolates that were submitted to previous testing with an inoculum range of 10⁴ to 10⁸ CFU/ml. The growth was not confluent with an inoculum of <10⁶ CFU/ml, while mutant colonies appeared and affected the reading of the inhibition zone with a higher inoculum. Consequently, 10⁶ CFU/ml was chosen as the alternative inoculum. Susceptibility determination was performed in duplicate for each testing method. Fosfomycin ECOFF was applied for the susceptibility categorization of the isolates.

Statistical analysis was performed using the Stata statistical software (Data Analysis and Statistical Software version 11.0).

Comparison between the agar dilution and the Etest methods tested with 10⁸ and 10⁶ CFU/ml was performed by using the Bland-Altman method (9). The mean MIC values obtained with the two compared methods (*x* axis) were plotted against the difference between such MICs (*y* axis). Intraclass correlation coefficient (ICC) was also calculated. Values for the kappa coefficient were interpreted according to the Landis and Koch classification (10).

Categorical agreement (CA), essential agreement (EA), major errors (ME), and very major errors (VME) were calculated according to the published guidelines (11). Error levels were computed as percentages along with their corresponding exact 95% confidence intervals (CI).

Agar dilution and disk diffusion results were compared by regression analysis. Spearman correlation coefficient was also estimated.

The *glpT* gene was amplified by PCR and was sequenced according to previously published methods (6, 7). Nucleotide and amino acid sequences were analyzed with the sequence analysis software Clone Manager 9 (Scientific and Educational Software).

Considering the Etest results (Table 1), EA was 93.6% for MICs

Received 14 September 2015 Returned for modification 8 November 2015

Accepted 28 November 2015

Accepted manuscript posted online 7 December 2015

Citation Díez-Aguilar M, Martínez-García L, Cantón R, Morosini MI. 2016. Is a new standard needed for diffusion methods for *in vitro* susceptibility testing of fosfomycin against *Pseudomonas aeruginosa*? Antimicrob Agents Chemother 60:1158–1161. doi:10.1128/AAC.02237-15.

Address correspondence to Rafael Cantón, rafael.canton@salud.madrid.org.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.



Capítulo 2

CAPÍTULO 2º

“ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE FOSFOMICINA Y TOBRAMICINA MEDIANTE CURVAS DE MUERTE BACTERIANA Y CONCENTRACIÓN PREVENTIVA DE LA APARICIÓN DE MUTANTES EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Caracterización molecular de la resistencia a fosfomicina en *P. aeruginosa*”

CAPÍTULO 2º:

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE FOSFOMICINA Y TOBRAMICINA MEDIANTE CURVAS DE MUERTE BACTERIANA Y CONCENTRACIÓN PREVENTIVA DE LA APARICIÓN DE MUTANTES EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*. Caracterización molecular de la resistencia a fosfomicina en *P. aeruginosa*.

1-OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 2º.

En muchos casos fosfomicina es una de las pocas opciones terapéuticas que quedan disponibles para las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistentes. Sin embargo, se sabe que la frecuencia de mutación de *P. aeruginosa* para fosfomicina es alta (10^{-6}) y por ello se debe administrar asociada con otros antimicrobianos.

El objetivo de este segundo capítulo fue el estudio de la actividad *in vitro* de fosfomicina asociada con diferentes antibióticos frente a aislados clínicos de *P. aeruginosa* mediante:

- Realización de **curvas de muerte bacteriana**
- Determinación de la **concentración preventiva de mutantes** y de la ventana de selección
- Análisis de la actividad antimicrobiana de la fosfomicina, tobramicina y de su combinación en ambiente aeróbico y anaeróbico.

Así mismo, como estudio complementario se realizó la **caracterización molecular de la resistencia** a fosfomicina en *P. aeruginosa*.

2-MATERIAL Y MÉTODOS

2.1-Cepas estudiadas

Cepas control

En los estudios de sensibilidad se utilizó como control la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Además para la estandarización de diferentes procedimientos se utilizó la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (73,104).

Cepas clínicas

Se utilizaron cepas clínicas de *P. aeruginosa* procedentes del estudio COMPACT anteriormente mencionado (86) aisladas de pacientes con bacteriemias y neumonías nosocomiales.

Adicionalmente el estudio se completó con 2 cepas procedentes de esputos de pacientes con fibrosis quística.

2.2-Determinación de la sensibilidad *in vitro*

La determinación de la CMI a fosfomicina, tobramicina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU) y a la combinación de fosfomicina y tobramicina se realizó mediante el método de la dilución en agar Muller-Hinton sin adicionar glucosa 6-P al medio. La sensibilidad en anaerobiosis también se realizó con el método de dilución en agar suplementado con un 1% de KNO₃ (p/v) (Sigma-Aldrich Chemical Co., EE.UU) utilizando el sistema de generación de atmósfera anaerobia GasPak™ EZ (BD, Sparks, MD, EE.UU).

La determinación de las CMIs al resto de antibióticos: aztreonam, colistina, meropenem y ciprofloxacino, se realizó mediante tiras de gradiente de concentraciones de CMI (Etest).

La categorización de los aislados en función de su sensibilidad se estableció según los puntos de corte clínicos estipulados por EUCAST (**Tabla 7**) y para fosfomicina se utilizó el punto de corte epidemiológico de 128 mg/l.

	Sensible ≤mg/l	Resistente >mg/l
Tobramicina	4	4
Aztreonam	1	16
Meropenem	2	8
Ciprofloxacino	0.5	1
Colistina	4	4

Tabla 7: Puntos de corte (EUCAST) para los distintos antibióticos utilizados

2.3-Estudio de sinergia antibiótica mediante curvas de muerte bacteriana

Se estudió la asociación antibiótica de fosfomicina con distintos antimicrobianos con actividad antipseudomónica mediante curvas de muerte bacteriana. Los antimicrobianos que se probaron en combinación con fosfomicina fueron: tobramicina, aztreonam, colistina, ciprofloxacino (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU) y meropenem (AstraZeneca, España, S.A.).

Todas las cepas tenían una CMI de fosfomicina de 64 mg/l, pero distinta sensibilidad para el resto de antibióticos.

Se estudió una cepa sensible y otra resistente a aztreonam, colistina, ciprofloxacino y meropenem. Todas ellas procedían del estudio COMPACT, citado anteriormente (Experimento 1-4) (**Tabla 8**).

		ATB1	CMI ATB1 mg/l	ATB2	CMI ATB2 mg/l
EXPERIMENTO 1	1.1	FOSFOMICINA	64	AZTREONAM	3
	1.2		64		24
EXPERIMENTO 2	2.1	FOSFOMICINA	64	MEROPENEM	1
	2.2		64		16
EXPERIMENTO 3	3.1	FOSFOMICINA	64	CIPROFLOXACINO	0.125
	3.2		64		>32
EXPERIMENTO 4	4.1	FOSFOMICINA	64	COLISTINA	1.5
	4.2		64		8

Tabla 8: Combinaciones de antibióticos utilizadas (ATB1, ATB2) con sus respectivas CMIs (mg/l) para la realización de las curvas de muerte

Las curvas de muerte con **fosfomicina y tobramicina** se reúnen en el experimento 5 y se realizaron utilizando dos cepas de fibrosis quística (*Pa4* y *Pa5*) en el límite de la sensibilidad a tobramicina (CMI= 4mg/l). *Pa4* presentó morfotipo no mucoso, y *Pa5* morfotipo mucoso. Así mismo se utilizaron 6 cepas procedentes del estudio COMPACT: *Pa1*, *Pa2*, *Pa3* sensibles a tobramicina y *Pa6*, *Pa7* y *Pa8* resistentes a tobramicina. Todas las cepas utilizadas en el experimento 5 eran sensibles a fosfomicina con una CMI de 64 mg/l (**Tabla 9**).

EXPERIMENTO 5	CEPA	FOSFOMICINA	TOBRAMICINA
		CMI (mg/l)	CMI (mg/l)
5.1	Pa1	64	2
5.2	Pa2	64	2
5.3	Pa3	64	1
5.4	Pa4	64	4
5.5	Pa5	64	4
5.6	Pa6	64	64
5.7	Pa7	64	64
5.8	Pa8	64	32

Tabla 9: Combinaciones de fosfomicina y tobramicina utilizadas con sus respectivas CMIs (mg/l) para la realización de las curvas de muerte dentro del experimento 5

Se estudió la actividad de cada antibiótico por separado y en combinación con fosfomicina a las 0, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 horas. Para ello se preparó un inóculo bacteriano de 10^5 - 10^6 UFC/ml que se inoculó en distintos tubos con 10 ml de Muller Hinton, cada uno de ellos conteniendo el antibiótico a estudio o la combinación. La concentración utilizada fue la concentración máxima sanguínea correspondiente a cada antibiótico (**Tabla 10**). En todos los experimentos se añadió un tubo sin antimicrobiano para control del inóculo bacteriano y un tubo sin antibiótico y sin inóculo bacteriano para control de esterilidad. A las horas establecidas se pipetearon 100 μ l de cada tubo y se realizaron las diluciones seriadas requeridas en tubos eppendorf con 900 μ l de solución salina. Posteriormente 100 μ l de estas diluciones se inocularon en placas de agar sangre que se incubaron 18 horas para el recuento de colonias.

La disminución de 3 o más \log_{10} en el recuento de UFC/ml se consideró como **efecto bactericida**. La reducción de 2 o más \log_{10} en el recuento de UFC/ml con la combinación antibiótica en comparación con el antibiótico más activo en solitario se definió como **sinergia**. Se consideró **indiferencia** cuando la reducción fue de menos de 1 \log_{10} con la combinación, comparado con el antibiótico más activo. **Antagonismo** se definió como un incremento de 2 \log_{10} o más en el recuento bacteriano con la combinación comparándolo con el antibiótico más activo en solitario (105).

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN MÁXIMA (mg/l)	REFERENCIA
FOSFOMICINA	90	(106)
TOBRAMICINA	10	(107)
AZTREONAM	75	(108)
COLISTINA	10	(109)
MEROPENEM	40	(110)
CIPROFLOXACINO	3.5	(111)

Tabla 10: Concentración máxima sanguínea correspondiente a cada antibiótico utilizada en los experimentos de curvas de muerte bacteriana

2.4-Determinación de la concentración preventiva de aparición de mutantes (CPM) y de la ventana de selección de aparición de mutantes (VSM).

Se determinó la CPM y VSM para fosfomicina, tobramicina y para la combinación de fosfomicina-tobramicina en aerobiosis y anaerobiosis para 5 cepas seleccionadas del experimento 5 de las curvas de muerte bacteriana (2 procedentes de fibrosis quística y 3 del estudio COMPACT). Tres de ellas eran sensibles a tobramicina (*Pa2* CMI=2 mg/l, *Pa4* CMI=4 mg/l, *Pa5* CMI=4 mg/l), y dos resistentes (*Pa8* CMI= 32mg/l, *Pa7* CMI= 64mg/l). Todas ellas con una CMI a fosfomicina de 64 mg/l.

Las CPM y VSM se determinaron tanto en ambiente aeróbico como en ambiente anaeróbico.

El protocolo se basó en el descrito anteriormente por Blondeau *et al.* (112). A partir de un cultivo puro en agar sangre de la cepa a estudio se suspendieron varias colonias en 10 ml de caldo Luria Broth (LB) (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, R.U) incubándose durante 16 horas a 37°C con agitación continua, hasta obtener un inóculo de aproximadamente 10^{10} UFC/ml (densidad óptica de 1 medida a 600nm). 100 µl de esta suspensión se inocularon en placas de Muller Hinton con diluciones seriadas de fosfomicina (desde 16 a 2048 mg/l), tobramicina (desde 0,5 a 512 mg/l) o de la combinación fosfomicina-tobramicina.

Para evaluar la combinación se utilizó una concentración fija de tobramicina (desde 0,5 a 64 mg/l) con concentraciones variables de fosfomicina (desde 8 a 256 mg/l). Las placas de Muller-Hinton utilizadas en atmósfera anaerobia se suplementaron con 1% KNO₃ (p/w) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU) (113). Se incubaron a 37°C durante 48 horas en aerobiosis

o en ambiente anaerobio generado por el sistema GasPak™ EZ (BD, Sparks, MD, EE.UU) (Figura 30). -

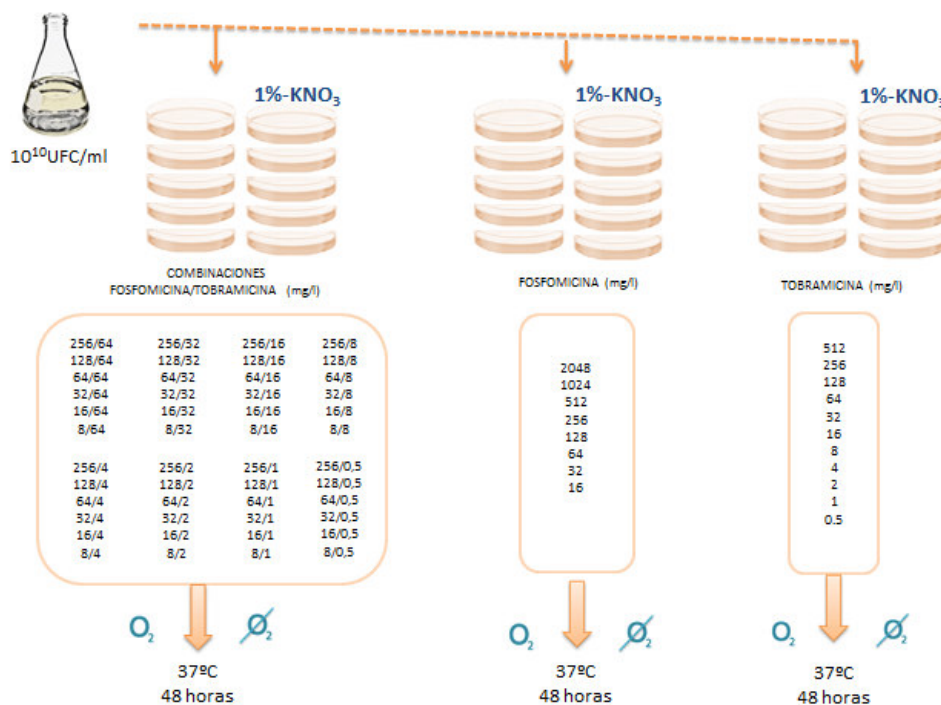


Figura 30: Esquema de las concentraciones de antibiótico y de las condiciones utilizadas para la determinación de las concentraciones preventivas de mutantes

La CPM se definió como la concentración antibiótica más baja que inhibió el crecimiento de colonias mutantes visibles (114) (Figura 31).

La CMI de las colonias mutantes crecidas en las placas con la concentración más alta de fosfomicina, tobramicina, o fosfomicina-tobramicina se determinó mediante Etest después de pases seriados en placas con agar que no contenían antibiótico.

La VSM para la combinación se determinó gráficamente representado la CMI y la CPM resultante para cada concentración de fosfomicina y tobramicina.

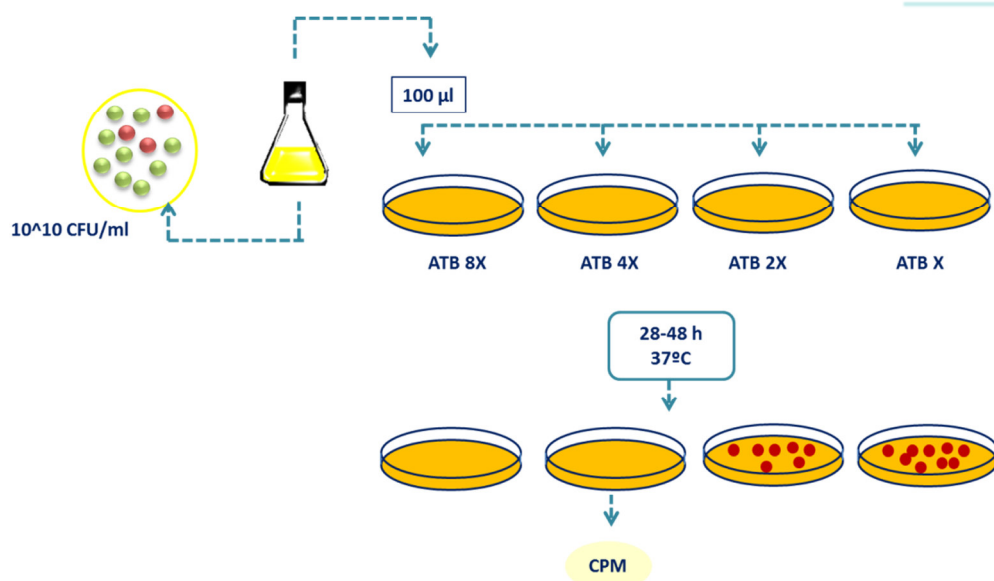


Figura 31: Esquema del protocolo utilizado para la determinación de la concentración preventiva de mutantes (CPM)

2.5-Detección de cepas hipermutadoras

La detección de cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Macià *et al.* (115). Se determinó el diámetro de inhibición por difusión con discos (Oxoid) para ceftazidima, imipenem, meropenem, tobramicina y ciprofloxacino en medio Muller-Hinton. Se utilizó el 0.5 McFarland para las cepas no mucosas y el 1 McFarland para las mucosas. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C y posteriormente se registró el diámetro del halo de inhibición. Tras 12 horas más de incubación se contabilizó la presencia o ausencia de subpoblaciones mutantes resistentes en el interior de los halos y se determinó el diámetro de halo más pequeño de la subpoblación resistente. Si la presencia de subpoblaciones de mutantes resistentes aparecía en 3 o más antibióticos la cepa se consideró hipermutadora. Las cepas PAO1 y PAOmutS se utilizaron como controles de la técnica.

2.6-Estudio del mecanismo de resistencia de *P. aeruginosa* a fosfomicina. Amplificación y secuenciación de *glpT*.

Para el estudio del **mecanismo de resistencia de *P. aeruginosa* a fosfomicina** se utilizó el procedimiento explicado anteriormente. Se amplificó y secuenció el gen *glpT* en los mutantes isogénicos generados en los estudios de CPM (*Pa2M*, *Pa4M*, *Pa5M*, *Pa7M*, *Pa8M*), y en sus cepas originales (*Pa2*, *Pa4*, *Pa5*, *Pa5*, y *Pa8*). Las secuencias se compararon con las cepas de control PAO1 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Así mismo, se añadieron otras 6 cepas (*Pa9-Pa14*)

con distintas CMI de fosfomicina (32-1024 mg/l) con el objetivo de estudiar las posibles mutaciones en cepas originalmente resistentes a fosfomicina.

La **modelización del transportador GlpT** se llevó a cabo a través del software SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) obteniendo una estructura hipotética de la proteína en 3D (**Figura 38**).

2.7-Estudio de la resistencia a aminoglucósidos

La resistencia a aminoglucósidos se estudió con una primera aproximación fenotípica mediante difusión con discos (Oxoid) de gentamicina, tobramicina, netilmicina, amicacina, y ciprofloxacino. Los resultados se interpretaron según el esquema de Vila *et al.* (116). La confirmación genotípica se basó en la amplificación por PCR y secuenciación de la enzima aminoglucosil-2-transferasa [ANT(2)-I] con los cebadores ant(2'')-Ia-F ACACAACGCAGGTCACA como cebador directo y ant(2'')-Ia-R CATGCGAGCCTGTAGGA como cebador reverso (117). *mexZ* y la región intergénica *mexX-mexZ* se amplificó y secuenció con los cebadores MexZ1026 CAGCGTGGAGATCGAAGGCAGCCGG, y MexZ2060 CCAGCAGGAATAGGGCGACCAGGGC (118). La secuencia se comparó con la publicada por Ramos Aires *et al.* (119). La búsqueda de homología entre secuencias nucleotídicas se realizó utilizando los algoritmos de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3-RESULTADOS

3.1-Curvas de muerte bacteriana

3.1.1-Experimento 1: Combinación de fosfomicina y aztreonam

1.1

1.2

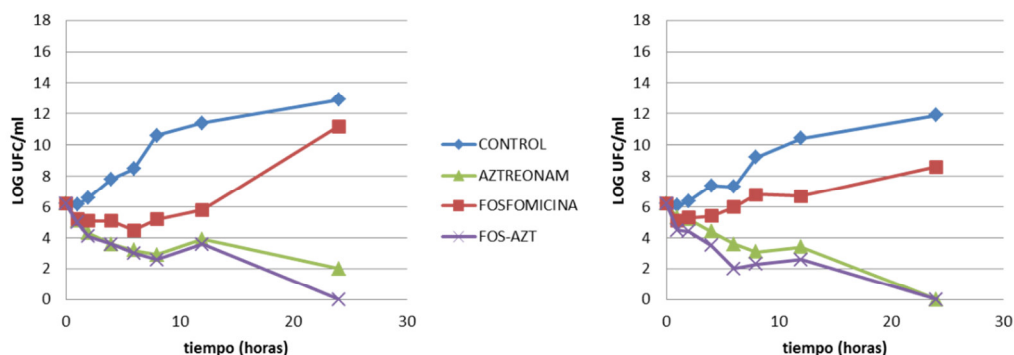


Figura 32: Curvas de muerte obtenidas con la combinación de fosfomicina y aztreonam. 1.1-cepa sensible a aztreonam. 1.2-cepa resistente a aztreonam

1.1	CMI fosfomicina = 64 mg/l	CMI aztreonam =3 mg/l
1.2		CMI aztreonam =24 mg/l

Cuando se combinó la fosfomicina con el aztreonam (**Figura 32**), en el caso de la cepa sensible a aztreonam, se observó un efecto bactericida tanto para el aztreonam como para la combinación a las 6 horas. En el caso de la combinación además se llegó a una inhibición completa del crecimiento a las 24 horas. La fosfomicina presentó un efecto bacteriostático con una disminución del inóculo bacteriano a las 6 horas de 1.69 log, con un recremento a partir de las 12 horas.

En el caso de la cepa resistente a aztreonam, el aztreonam presentó un efecto bactericida a las 8 horas mientras que la combinación fue bactericida a las 6 horas. En ambos casos se llegó a la inhibición total del crecimiento a las 24 horas. La fosfomicina presentó efecto bacteriostático con recremento a partir de las 6 horas.

3.1.2-Experimento 2: Combinación de fosfomicina y meropenem

2.1

2.2 -

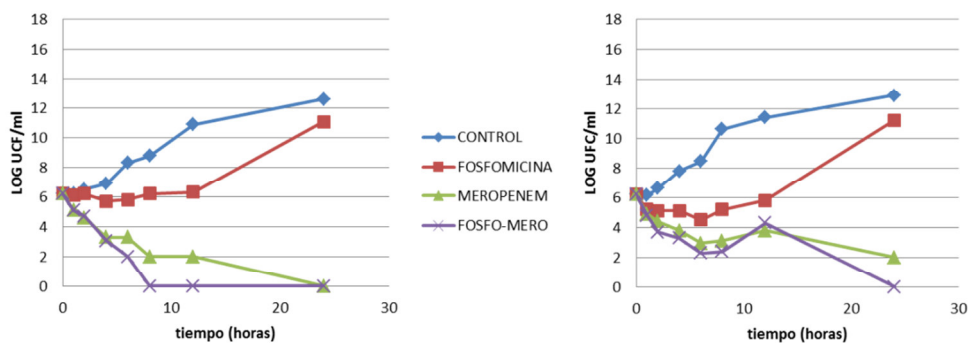


Figura 33: Curvas de muerte obtenidas con la combinación de fosfomicina y meropenem. 2.1- cepa sensible a meropenem. 2.2-cepa resistente a meropenem

2.1	CMI fosfomicina = 64 mg/l	CMI meropenem =1mg/l
2.2		CMI meropenem =16 mg/l

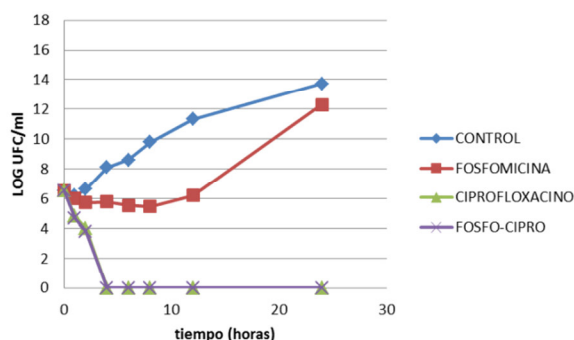
En el aislado sensible a meropenem, este compuesto sin asociar se comportó como antibiótico bactericida a las 8 horas y consiguió inhibir el recuento a las 24 horas, mientras que la combinación demostró una actividad bactericida a las 4 horas, y una sinergia e inhibición total del recuento bacteriano a las 8 horas.

Respecto a la cepa resistente al meropenem, la combinación y el meropenem presentaron efecto bactericida a las 6 horas, y la combinación consiguió inhibir el crecimiento a las 24 horas.

La fosfomicina en ambos aislados se comportó como antibiótico bacteriostático, presentando recremento a las 24 horas (**Figura 33**).

3.1.3-Experimento 3: Combinación de fosfomicina y ciprofloxacino

3.1



3.2

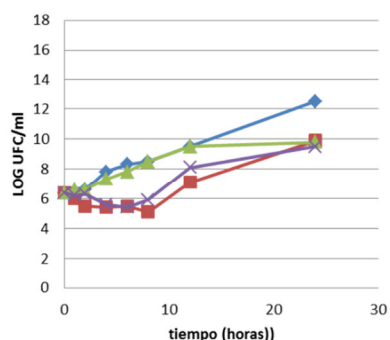


Figura 34: Curvas de muerte obtenidas con la combinación de fosfomicina y ciprofloxacino. 3.1- cepa sensible a ciprofloxacino. 3.2- cepa resistente a ciprofloxacino

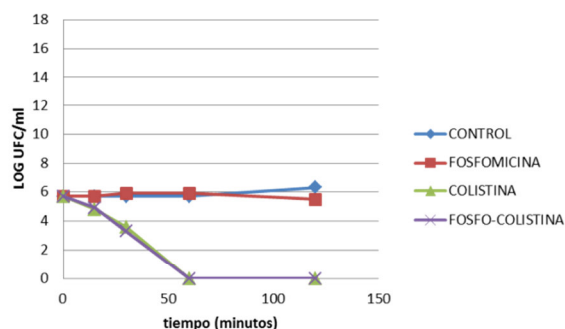
3.1	CMI fosfomicina = 64 mg/l	CMI ciprofloxacino = 0.125 mg/l
3.2		CMI ciprofloxacino >32 mg/l

En el caso de la cepa sensible a ciprofloxacino el comportamiento de este antibiótico y de su combinación con la fosfomicina fue prácticamente superponible, presentado actividad bactericida e inhibición del recuento bacteriano a las 4 horas. Fosfomicina presentó efecto bacteriostático con recrecimiento a las 24 horas. En el caso de la cepa resistente, ciprofloxacino no consiguió disminuir el recuento bacteriano en ningún momento, mientras que la fosfomicina y la combinación presentaron un comportamiento bacteriostático similar (Figura 34).

Estos resultados demuestran que en ambos casos la asociación de fosfomicina y ciprofloxacino no presentó ninguna ventaja y se comportó como una asociación indiferente.

3.1.4-Experimento 4: Combinación de fosfomicina y colistina

4.1



4.2 -

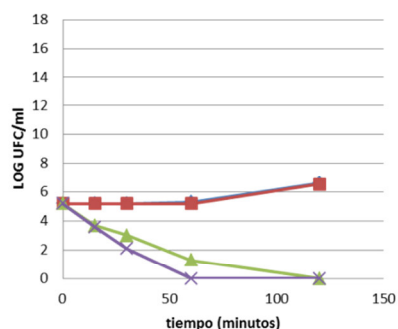


Figura 35: Curvas de muerte obtenidas con la combinación de fosfomicina y colistina. 4.1-cepa sensible a colistina. 4.2-cepa resistente a colistina

4.1	CMI fosfomicina = 64 mg/l	CMI colistina = 1.5 mg/l
4.2		CMI colistina = 8 mg/l

En el caso de la colistina (**Figura 35**), el efecto bactericida tanto en la cepa sensible como en la cepa resistente ocurrió de manera muy temprana. Por ello, el recuento al realizar la curva de muerte se realizó cada 15 minutos durante un tiempo de 2 horas. En el caso de la cepa sensible, cuando se utilizó la concentración máxima de 10 mg/l, a los 15 minutos la colistina ya había producido la inhibición total del crecimiento bacteriano. Por ello, para estudiar la cinética bactericida en este aislado, se utilizó una concentración de colistina igual a su CMI (1.5 mg/l). Así se observó una inhibición total del recuento a los 60 minutos. La combinación con fosfomicina fue indiferente. En el caso del aislado resistente a la colistina, ésta presentó un efecto bactericida a los 60 minutos, con un recuento nulo a los 120 minutos. Aunque la combinación no fue sinérgica, la actividad bactericida se produjo a los 30 minutos, adelantándose la inhibición total del crecimiento a los 60 minutos. La inhibición total del crecimiento bacteriano tanto para la colistina como para la combinación se mantuvo las 24 horas para los dos aislados.

3.1.5-Experimento 5: Combinación de fosfomicina y tobramicina

La combinación con tobramicina fue estudiada más extensamente, analizando además cepas procedentes de fibrosis quística (*Pa 4* y *Pa5*). Los resultados de las curvas de muerte se representan en la **Figura 36**.

Fosfomicina presentó una actividad bacteriostática con una reducción del inóculo original de 0.2-2.15 log₁₀ de UFC/ml; entre las 12-24 horas en todos los casos se produjo un recrecimiento cuando el antibiótico se evaluó en solitario.

Para las cepas sensibles a tobramicina *Pa1* (CMI=2 mg/l), *Pa2* (CMI=2 mg/l) y *Pa3* (CMI=1 mg/l), la **tobramicina** en solitario presentó un efecto bactericida dentro de las 4 primeras horas, y para todas ellas se produjo una inhibición completa del crecimiento. La combinación con fosfomicina en estos casos fue indiferente. Para el aislado *Pa4* (CMI = 4mg/l) la tobramicina presentó un perfil bacteriostático con una reducción del inóculo original a las 12 horas de 2.1 log₁₀ de UFC/ml, presentando un recrecimiento a las 24 horas. En este aislado la combinación de fosfomicina y tobramicina fue sinérgica y bactericida, con una reducción del inóculo original de 3 log₁₀ de UFC/ml en las 4 primeras horas, y una inhibición total del recuento a las 6 horas que se mantuvo hasta el final de la curva.

Para el aislado *Pa5* (CMI = 4mg/l) la tobramicina fue bactericida a las 8 horas, mientras que la combinación de fosfomicina y tobramicina fue sinérgica y bactericida con una completa inhibición del recuento bacteriano a las 4 horas.

Respecto a los **aislados resistentes a la tobramicina** *Pa6* (CMI =64 mg/l), *Pa7* (CMI =64 mg/l), y *Pa8* (CMI=32 mg/l) la tobramicina por sí sola no pudo reducir el inóculo bacteriano. En el aislado *Pa7*, la combinación presentó un efecto bacteriostático a las 8 horas, pero no consiguió reducir el inóculo original a las 24 horas. Para los otros dos aislados resistentes a la fosfomicina, la combinación fue indiferente.

No se observó antagonismo en ningún caso.

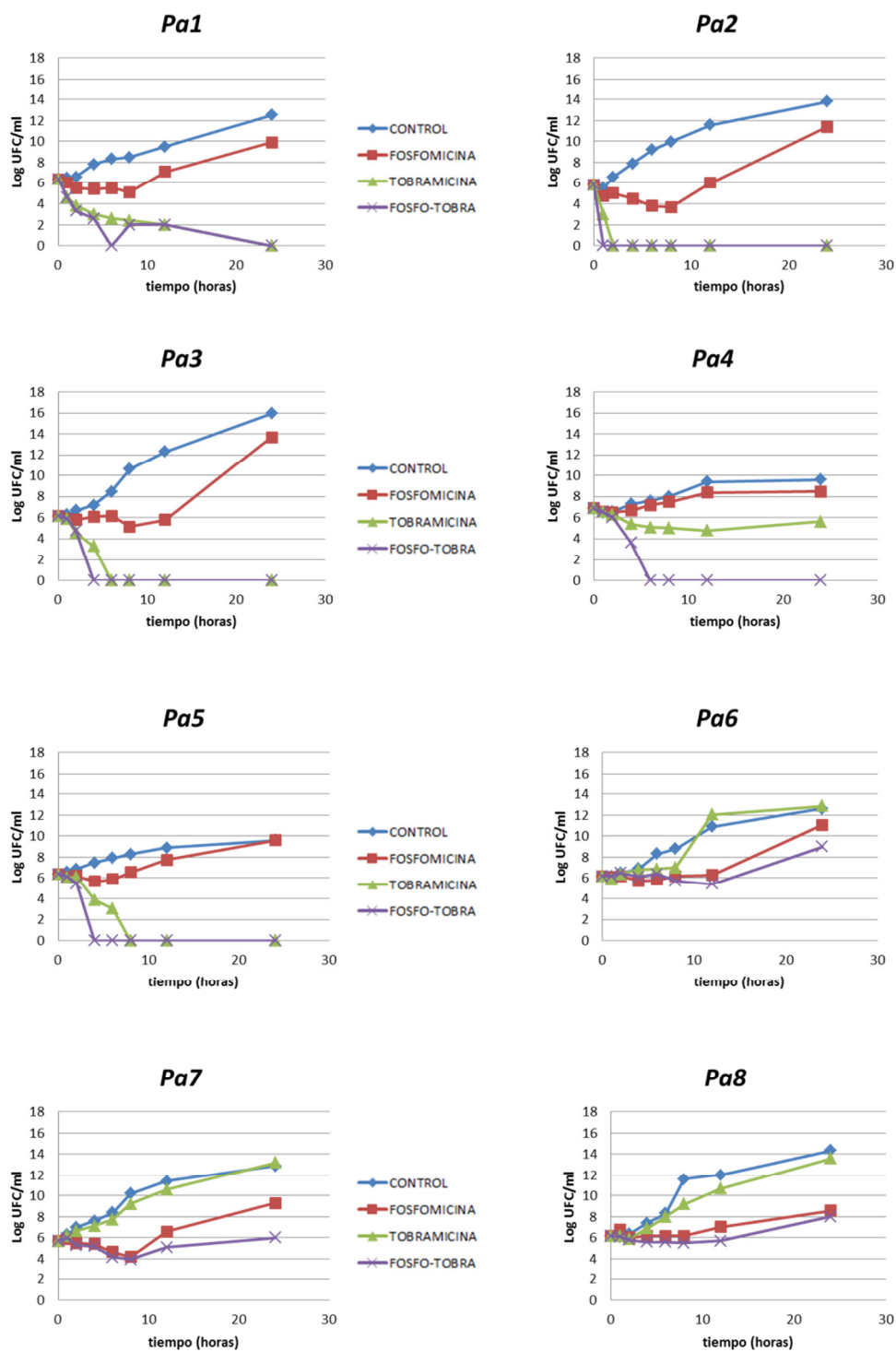


Figura 36: Curvas de muerte obtenidas para la combinación de fosfomicina y tobramicina en los 8 aislados de *P. aeruginosa*. Sensibles a tobramicina (Pa1-Pa5) y resistentes a tobramicina (Pa6-Pa8).

3.2-Concentración que previene la aparición de mutantes

Los resultados de los ensayos de concentración preventiva de mutantes realizados en aerobiosis y anaerobiosis están reflejados en la **Tabla 11**.

Para la **fosfomicina**, las CMI's para todos los aislados, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis fue de 64 mg/l. Las CPM's alcanzaron un valor de >2048 mg/l en aerobiosis y 2048 en anaerobiosis.

Para la **tobramicina**, los tres aislados con CMI dentro del rango de sensibilidad en aerobiosis (*Pa2*= 2 mg/l, *Pa4*= 4 mg/l, *Pa5*= 4 mg/l) pasaron a tener CMI's dentro del rango de la resistencia en anaerobiosis (*Pa2*= 8 mg/l, *Pa4*= 64 mg/l, *Pa5*=32 mg/l). Las CPM's de tobramicina fueron de dos a tres diluciones más altas en anaerobiosis que en aerobiosis.

Para los dos aislados resistentes a tobramicina (*Pa7* y *Pa8*), las CMI's en anaerobiosis y las CPM's en aerobiosis y anaerobiosis fueron >512 mg/l.

Para las combinaciones de fosfomicina-tobramicina, las CMI's, CPM's, y las ventanas de selección de mutantes obtenidas para las distintas concentraciones de la combinación de fosfomicina y tobramicina en aerobiosis y anaerobiosis están representados en la **Figura 37**. En los aislados resistentes a tobramicina (*Pa7* y *Pa8*), la ventana de selección obtenida fue muy amplia, incluso con altas concentraciones de fosfomicina y tobramicina. Sin embargo, para los aislados sensibles a tobramicina (*Pa2*, *Pa4* y *Pa5*) las ventanas de selección de mutantes disminuyeron, incluso fueron nulas en ambos ambientes.

Aislado	CMI Fosfomicina (mg/l)		CPM Fosfomicina (mg/l)		CMI Tobramicina (mg/l)		CPM Tobramicina (mg/l)	
	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis
Pa2	64	64	>2048	2048	2	8	16	64
Pa4	64	64	>2048	2048	4	64	32	256
Pa5	64	64	>2048	>2048	4	32	32	256
Pa7	64	64	>2048	2048	64	>512	>512	>512
Pa8	64	64	>2048	2048	32	>512	>512	>512

Tabla 11: Resultados de CMI y de CPM de fosfomicina y tobramicina obtenidos tanto en aerobiosis como en anaerobiosis

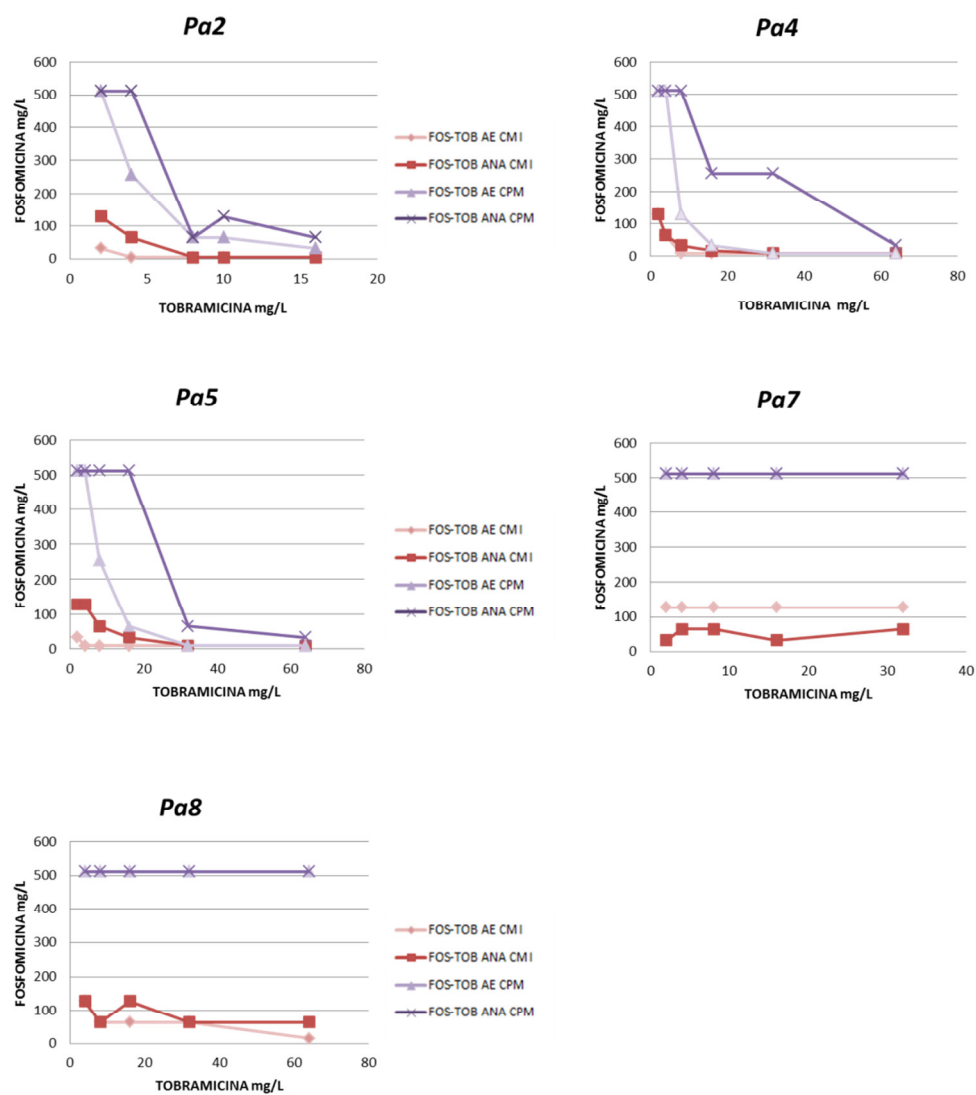


Figura 37: Representación gráfica de la CMI y CPM (ventana de selección) para la combinación de fosfomicina (FOS) y tobramicina (TOB) en aerobiosis (AE) y anaerobiosis (ANA).

3.3-Detección de fenotipo hipermutador:

Siguiendo el esquema de Macià *et al.* ninguna de las cepas estudiadas presentó fenotipo hipermutador. Los resultados se describen en la **Tabla 12** y se expresan según el número de colonias observadas en el interior de los halos: 1-10 (+), 10-100 (++), >100 (+++). Solo se consideraron las colonias que producían una disminución del halo de inhibición mayor o igual a 5 mm, excepto para la tobramicina en cuyo caso cualquier colonia fue considerada. La ceftazidima únicamente se consideró cuando se registró un conteo de >10 colonias. Con estas condiciones, ninguna de ellas presentó subpoblaciones mutantes en 3 o más antibióticos.

	CEFTAZIDIMA	IMIPENEM	MEROPENEM	CIPROFLOXACINO	TOBRAMICINA
PAO1	0	0	+	0	0
PAOmutS	+++	++	++	++	++
Pa2	+	0	0	0	+
Pa4	++	+++	0	0	0
Pa5	0	0	0	0	0
Pa7	+	+	+	0	0
Pa8	+	0	+	0	0

Tabla 12: Detección de subpoblaciones mutantes para los distintos antibióticos

3.4- Caracterización de los mecanismos de resistencia

3.4.1- Caracterización de la resistencia a tobramicina

Las cepas *Pa4* y *Pa5* (aislados de fibrosis quística) con CMI en el límite de la sensibilidad a tobramicina (4 mg/l) presentaron sensibilidad intermedia a ciprofloxacino y a todos los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, netilmicina, amikacina), lo que fenotípicamente, según el esquema propuesto por Vila *et al.* correspondería a un mecanismo de resistencia causado por la hiperexpresión de la bomba de flujo MexXY-OprM.

Este planteamiento se confirmó genotípicamente por la amplificación y secuenciación del gen represor *mexZ* y de la región intergénica *mexZ-mexX*. Se observó una delección de una guanina (G) en la posición 72, lo que resultó en un cambio en el marco de lectura en estos dos aislados. No se detectaron mutaciones en la región intergénica *mexZ-mexX*, clasificándose por tanto como mutantes del tipo *agrZ* (*aminoglycoside resistant mutants dependent on mexZ*). La alteración de esta proteína represora MexZ explicaría la hiperproducción del sistema de

expulsión activa, y como consecuencia la resistencia de bajo nivel a la tobramicina. Este mecanismo de resistencia en el que está implicada la hiperproducción de MexXY-OprM, es la principal causa de panresistencia a aminoglucósidos en aislados procedentes de fibrosis quística.

Para los aislados con un alto nivel de resistencia a tobramicina (*Pa6*, *Pa7* y *Pa8*), el perfil de sensibilidad correspondió al generado por la enzima adeniltransferasa (2')-I (ANT (2')-I), que confiere alto nivel de resistencia a la gentamicina y a la tobramicina, preservando la sensibilidad a netilmicina y a ampicacina. Esto fue confirmado por amplificación y secuenciación del gen codificante para esta enzima.

3.4.2-Bases moleculares implicadas en la resistencia a fosfomicina. Modelización proteica del transportador GlpT.

Se amplificaron y secuenciaron los genes *glpT* de los aislados originalmente sensibles a fosfomicina con CMI de 64 mg/l y de sus mutantes obtenidos de los ensayos de CPM con CMI > 1024 mg/l.

Las secuencias se analizaron y compararon con la secuencia de la cepa salvaje de referencia PAO1. Los resultados mostraron que todas las cepas con una CMI igual o por debajo del ECOFF (128 mg/l), no presentaron mutaciones en la secuencia del gen *glpT*. Sin embargo, tanto los mutantes derivados de los ensayos de CPM, como los aislados con una CMI originariamente mayor de 128 mg/l, presentaron mutaciones en la secuencia de *glpT* que codificaron cambios en la secuencia aminoacídica (**Tabla 13**).

Tres de estas cepas mutantes (*Pa2M*, *Pa5M* y *Pa8M*) presentaron cambios en el marco de lectura por inserciones o deleciones en la secuencia que resultaron en codones de parada prematuros. Las secuencias aminoacídicas incompletas dieron lugar a proteínas truncadas. *Pa7M* presentó deleciones que confirieron la pérdida de varios aminoácidos en la proteína. *Pa4M* y las dos cepas originariamente con CMI de 512 mg/l (*Pa13*) y 1024 mg/l (*Pa14*) presentaron mutaciones puntuales por cambios de nucleótidos en las secuencias que se tradujeron en cambios de aminoácidos en las correspondientes proteínas.

Así mismo, a lo largo de las secuencias se produjeron mutaciones silenciosas, es decir cambios nucleotídicos que no causaron cambio de aminoácido. El polimorfismo de este gen en cada aislado está representado en la **Tabla 14**.

Cepas originales o derivados mutantes	Mutaciones en la secuencia del <i>glpT</i>	CMI de fosfomicina (mg/l)
Pa2	Sin mutación	64
Pa2M	C ₆₈₁ delección (1pb frameshift), codón stop TGA ₉₈₇	>1024
Pa4	Sin mutación	64
Pa4M	G por A; G ₃₅₈ (G ₁₀₇₂ GC)---S (A ₁₀₇₂ GC)	>1024
Pa5	Sin mutación	64
Pa5M	C ₃₉₈ insercción (1pb frameshift), codón stop TGA ₅₁₄	>1024
Pa7	Sin mutación	64
Pa7M	G ₂₁₁ CCATC ₂₁₆ delección (6pb frameshift), Δ A ₇₁ -I ₇₂	>1024
Pa8	Sin mutación	64
Pa8M	G ₃₅₅ insercción (1pb frameshift), codón stop TAA ₃₉₀	>1024
Pa9	Sin mutación	32
Pa10	Sin mutación	128
Pa11	Sin mutación	128
Pa12	Sin mutación	128
Pa13	G por A; A ₁₂₁ (G ₃₆₁ CC)---T(ACC)	512
Pa14	A por C; T ₂₁₁ (A ₆₃₁ CC)---P (CCC)	1024

Tabla 13: Mutaciones en la secuencia del gen *glpT* obtenidas en las cepas originales (Pa2, Pa4, Pa5, Pa7, Pa8) y en sus mutantes resultantes de los ensayos de CPM (Pa2M, Pa4M, Pa5M, Pa7M, Pa8M), así como en las cepas adicionales con distintas CMI para fosfomicina (Pa9-Pa14).



Tabla 14: Polimorfismo del gen *glpT* implicado en la resistencia a fosfomicina. En la figura se han representado los segmentos del gen donde se han encontrado polimorfismos (desde el nucleótido 102 hasta el nucleótido 1339). La secuencia total posee 1347 nucleótidos.

En las cepas *Pa2M*, *Pa5M* y *Pa8M*, las mutaciones resultaron en codones de parada prematuros, que dieron lugar a proteínas incompletas: en la cepa *Pa2M* el codón de parada tuvo lugar en el aminoácido de la posición 328 localizado en la α -hélice 9 (H9), por lo que hubo una pérdida de 3 α -hélices. En el aislado *Pa5M* el codón de parada se situó en la posición aminoacídica 171 localizado en la H5, por lo que se perdieron 7 α -hélices. En *Pa8M* el codón de parada se situó en la posición aminoacídica 129 localizado en la H4, por lo que la proteína perdió 7 α -hélices.

En el aislado *Pa7M* se perdieron 2 aminoácidos que distorsionaron la H2 involucrada en la formación del poro de la proteína. La sustitución del aminoácido en el mutante *Pa4M* se localizó en la hélice central H10.

Las modelizaciones de las proteínas obtenidas con el programa SWISS-Model al introducir la secuencia aminoacídica se pueden observar en la **Figura 38**.

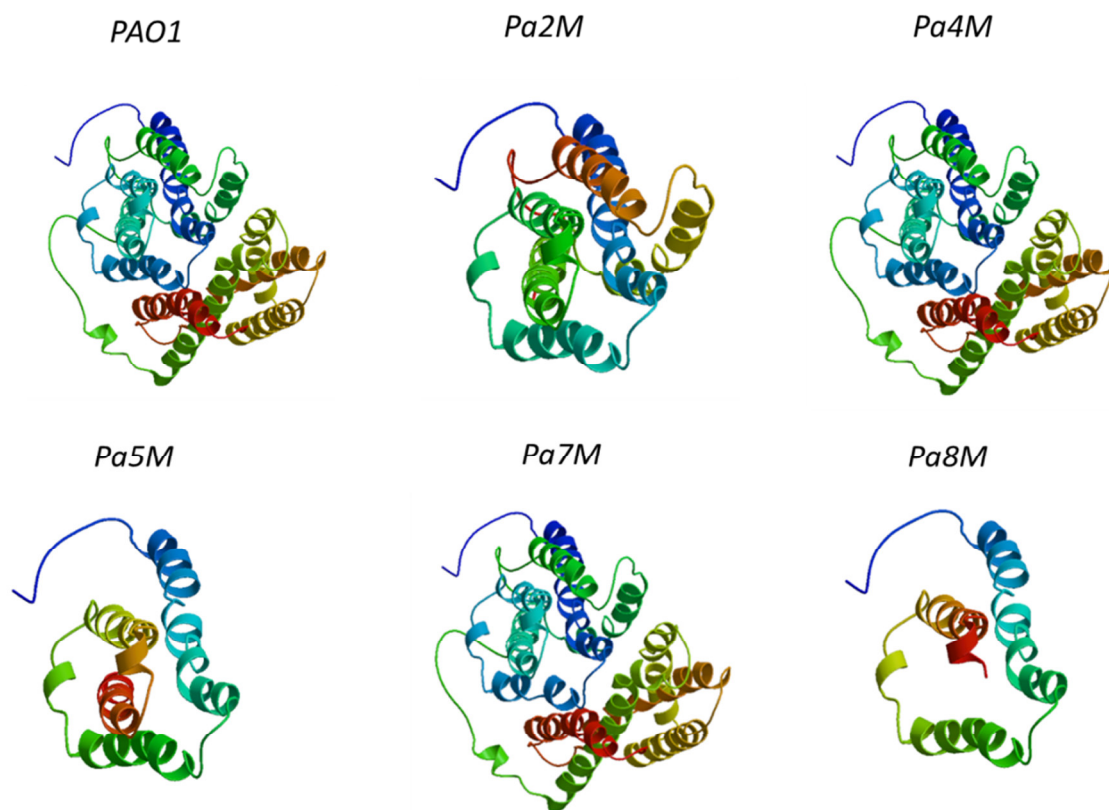


Figura 38: Representación tridimensional de la proteína transportadora GlpT en la cepa de referencia PAO1 y en los mutantes de fosfomicina: *Pa2M*, *Pa4M*, *Pa5M*, *Pa7M*, y *Pa8M*

5-DISCUSIÓN

Ante el número creciente de aislados de *P. aeruginosa* multirresistentes, se ha revalorizado la utilización de antibióticos como la fosfomicina para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo. Sin embargo los datos que existen sobre su actividad, tanto *in vitro* como *in vivo*, son escasos. En la literatura hay revisiones que recopilan estudios, series y casos clínicos, sobre el empleo de fosfomicina en estas situaciones (9), sin embargo hasta la fecha no existe ningún ensayo clínico.

Ante este escenario, hemos investigado mediante distintas aproximaciones la actividad *in vitro* de este compuesto asociado a otros antibióticos.

En nuestro ensayo de curvas de muerte, fosfomicina ha demostrado tener actividad bacteriostática frente a *P. aeruginosa*, presentando una reducción del recuento bacteriano de 0.2-2.15 log₁₀ dentro de las 8 primeras horas, produciéndose un recrecimiento en todos los casos a las 24 horas.

Esto recalca una vez más que la administración de fosfomicina en solitario para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* no es recomendable. De hecho, la estrategia para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo se basa en terapias combinadas con el objetivo de evitar la selección de mutantes resistentes y de conseguir una actividad antibiótica sinérgica (120).

La rápida aparición de resistencias en monoterapia es debida a que la afectación del transportador GlpT en *Pseudomonas* no conlleva un coste biológico asociado, ya que este microorganismo puede utilizar un amplio número de compuestos que suplementarían la falta de glicerol 3-fosfato, y además el gen *glpT* no está regulado por el AMPc. Sin embargo, con la utilización de asociaciones antibióticas, la frecuencia de mutación a este antibiótico disminuye, evitando de este modo la aparición de resistencias (32).

De aquí la importancia del estudio de la actividad de fosfomicina en combinación con otros antimicrobianos. En nuestros ensayos de curvas de muerte bacteriana se ha observado que las asociaciones con el **meropenem** y la **tobramicina** podrían resultar sinérgicas. Y en algunos casos la asociación presentó la ventaja de conseguir la inhibición completa del crecimiento bacteriano, como con el aztreonam o el meropenem, antibióticos que por separado no consiguieron inhibir totalmente el recuento a las 24 horas (caso 1.1 y 1.2). Las **asociaciones de carbapenémicos** con fosfomicina están publicadas en la literatura para el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas*. Doripenem y fosfomicina a altas dosis ha sido utilizada con éxito para el tratamiento de neumonía causada por *P. aeruginosa* con carbapenemasa (121). Así mismo estudios *in vitro* avalan esta asociación, como el publicado

por Samonis *et al.* donde el 73.3% de los aislados de *P. aeruginosa* multirresistente - presentaron sinergia con fosfomicina y doripenem (122), y con imipenem (123).

Según los resultados de las curvas de muerte con **ciprofloxacino**, su asociación con fosfomicina no presentó sinergia ni ventaja alguna. Sin embargo, existen trabajos publicados en los que sí se ha demostrado efecto sinérgico, alcanzándose cifras de hasta el 40% de aislados de *P. aeruginosa* con carbapenemasa con sinergia para esta combinación (124). En modelos de *biofilm* la asociación también ha resultado ser sinérgica (125).

La **colistina** presentó un efecto bactericida muy potente, dentro de las dos primeras horas tanto con la cepa sensible como la resistente se consiguió inhibir el recuento bacteriano. En el caso de la cepa resistente este efecto se adelantó con la combinación con fosfomicina. Es importante recalcar que la asociación con fosfomicina no ha resultado antagónica con ningún antibiótico.

En este trabajo, la **asociación con tobramicina** se ha estudiado más ampliamente, incluyendo aislados procedentes de fibrosis quística, y determinando su actividad mediante curvas de muerte e inducción de resistencias (CPM) en varios ambientes, con el objetivo de imitar las condiciones microaerófilas o anaeróbicas en las que transcurren determinadas infecciones. Este es el caso de la fibrosis quística, donde la formación de biopelículas en el parénquima pulmonar crea un ambiente con menor cantidad de oxígeno.

P. aeruginosa es un microorganismo muy versátil, capaz de crecer en ambientes sin oxígeno, utilizando como aceptores de electrones alternativos NO_3^- , NO_2^- o arginina. Estos compuestos están aumentados en la vía respiratoria del paciente con fibrosis quística, por lo que *Pseudomonas* es capaz de generar energía a través de su reducción (66).

El estudio de los antimicrobianos en esta atmósfera es importante, ya que algunos de ellos como los aminoglucósidos o los β -lactámicos pierden parte de su actividad en estas condiciones. Los aminoglucósidos son menos activos en anaerobiosis ya que la penetración al interior celular sucede con dificultad. Estos antibióticos están cargados positivamente y se produce una adsorción con las cargas negativas de los polímeros del alginato presentes en el *biofilm*. Además, la entrada a través del transportador es dependiente de una reacción de fosforilación oxidativa (126).

Por ello, en situaciones en las que las infecciones transcurren en microaerofilia o anaerobiosis, sería importante que la administración de aminoglucósidos se realizara en combinación con otros compuestos.

La fosfomicina mantiene su actividad en anaerobiosis y algunos estudios han registrado una alta actividad en estas condiciones (113).

Según distintos estudios, la asociación de la fosfomicina y tobramicina ha demostrado ser sinérgica (43,123) y además de presenta interés por distintos aspectos. Esta asociación se ha desarrollado para el tratamiento de la fibrosis quística, evaluándose su actividad en ensayos clínicos como antibiótico inhalado a concentración FT 4:1(12). Se ha determinado su actividad sobre un modelo de *biofilm* en células de vía respiratoria de fibrosis quística, donde ha sido capaz de erradicarlo (13).

La asociación de estos antibióticos en un ambiente anaeróbico ha demostrado ser ventajosa ya que regula negativamente la expresión génica de la enzima nitrato reductasa, esencial para el crecimiento de *Pseudomonas* en ambiente anaeróbico (45).

El incremento de la actividad antibiótica con la asociación de fosfomicina y tobramicina se debe a que la fosfomicina potencia el transporte activo de la tobramicina al interior celular, aunque el mecanismo por el que esto se consigue no se ha definido aún. En un estudio reciente, la adición de 10 mg/l de fosfomicina resultó en un incremento de la entrada de tobramicina del 170% y se aumentó la inhibición de la síntesis proteica, siendo éste el principal mecanismo de acción de la combinación, dejando como secundario el efecto de la inhibición de la pared celular del que es responsable la fosfomicina (127).

Otro beneficio de esta asociación sería el efecto protector de la fosfomicina frente a los efectos secundarios de los aminoglucósidos como la nefrotoxicidad (128), además de la posibilidad de disminuir la dosis de administración de tobramicina en la terapia combinada que conllevaría también una reducción de estos efectos.

En nuestro trabajo, la asociación de fosfomicina y tobramicina ha demostrado ser sinérgica y potenciar el efecto bactericida, así como evitar la aparición de mutantes resistentes.

Es importante que la sinergia se produzca dentro de las 8 primeras horas, considerándose en este estudio las sinergias en este periodo.

Para los aislados sensibles a tobramicina con CMI de 4 mg/l, procedentes de fibrosis quística, la combinación fue sinérgica y bactericida. En uno de estos aislados la tobramicina por sí sola no fue bactericida. Esto podría ser debido a que la tobramicina es un antibiótico concentración dependiente y la CMI de este aislado está muy próxima al punto de corte clínico. Se necesitarían estudios en los que se determinara el valor del objetivo PK/PD para la combinación, con los que se podría observar el efecto del valor de la CMI o de la dosis de los antibióticos que forman parte de la combinación.

El punto de corte clínico de tobramicina para *P. aeruginosa* (4 mg/l) no coincide con el ECOFF que está definido en 2 mg/l. Esto hace que aislados con mecanismos de resistencia, es decir que no pertenezcan a la población salvaje, puedan clasificarse dentro de la categoría de

sensibles. Es el caso de estos dos aislados, que presentan resistencia de bajo nivel a tobramicina determinada por la alteración en la bomba de expulsión MexXY. MexZ es una proteína represora que regula negativamente esta bomba de expulsión y mutaciones en el gen *mexZ* comúnmente confieren resistencia a los aminoglucósidos en *P. aeruginosa* procedentes de fibrosis quística (74,129). La sinergia de esta combinación podría estar relacionada con el tipo de mecanismo de resistencia a aminoglucósidos involucrada. La alteración de MexXY-OprM está implicada en el incremento de la expulsión del aminoglucósido al exterior celular, y a pesar de que la fosfomicina no está impidiendo esta expulsión, el hecho de que favorezca la entrada podría aumentar la acumulación de la tobramicina en el interior celular y de esta manera llegar a una concentración suficiente que permitiera el efecto bactericida.

En los aislados con CMI para tobramicina entre 1-2 mg/l el efecto sinérgico no se apreció debido a la fuerte acción bactericida de la tobramicina por sí sola. Aun así, los resultados de CMI y CPM en anaerobiosis apoyan su uso en combinación en infecciones que transcurren en este ambiente, ya que los aislados que fueron sensibles en aerobiosis, incrementaron su CMI en anaerobiosis pasando a la categoría de resistentes. Así mismo, estos antibióticos por separado no consiguieron prevenir la aparición de mutantes resistentes, obteniéndose altos valores de CPM, sobre todo para la fosfomicina. Por el contrario, la combinación consiguió disminuir el rango de la ventana de selección de mutantes resistentes tanto en aerobiosis como anaerobiosis.

Por tanto, la selección de mutantes resistentes durante una terapia con esta combinación en aislados sensibles a ambos antibióticos, sería improbable. Esta misma conclusión fue descrita en otro trabajo en el que se observó que la combinación de fosfomicina y tobramicina prevenía la aparición de mutantes resistentes a ambos antibióticos, incluso con cepas hipermutadoras (101). Esto es importante en infecciones crónicas donde la aparición de mutantes resistentes es comúnmente lo que provoca el fracaso terapéutico.

Para los **aislados con resistencia a tobramicina de alto nivel**, debida a la acción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, la posibilidad de utilizar la combinación con fosfomicina queda descartada por la ausencia de sinergia y las amplias ventanas de selección de mutantes resistentes obtenidas, tanto en aerobiosis como anaerobiosis. En estos casos el tratamiento con esta combinación no tendría que utilizarse.

Como se ha comentado anteriormente, el transporte de la fosfomicina al interior celular en *P. aeruginosa* se realiza únicamente a través de la permeasa GlpT (30,36). En este estudio se ha observado que mutaciones en el gen *glpT* que codifica para esta permeasa, provocan resistencia a fosfomicina en este microorganismo. Para cada aislado se detectaron

distintas mutaciones a lo largo del gen *glpT* que causaron cambios en la proteína truncando de esta manera su actividad. Como consecuencia, la entrada de fosfomicina se ve impedida, traduciéndose en resistencia a este antibiótico. Estas mutaciones causan aumentos muy elevados de CMI en los mutantes, ya que no hay otra alternativa de entrada para fosfomicina en este microorganismo. Anteriormente, se describieron igualmente distintas mutaciones en el gen *glpT* en aislados de *P. aeruginosa* resistentes a fosfomicina (30).

Actualmente, ni EUCAST ni CLSI han establecido un punto de corte clínico para *P.aeruginosa* y fosfomicina. EUCAST sin embargo ha definido el ECOFF en 128 mg/l (39). Este estudio ha confirmado que los aislados con CMI igual o por debajo de este ECOFF no presentaron mutaciones en el gen *glpT*, lo que demuestra que forman parte de la población salvaje. Este hecho refuerza el concepto del ECOFF y ante la falta de un punto de corte clínico se pueden inferir mecanismos de resistencia al antibiótico mediante este valor y de este modo tener conocimiento del tipo de aislado.



ANEXO 3

Antimicrobial Activity of Fosfomycin-Tobramycin Combination against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Assessed by Time-Kill Assays and Mutant Prevention Concentrations

María Díez-Aguilar,^{a,b} María Isabel Morosini,^{a,b} Ana P. Tedim,^{a,c,d} Irene Rodríguez,^{a,c} Zerrin Aktaş,^e Rafael Cantón^{a,b,d}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^a; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^b; CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^c; Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain^d; Department of Clinical Microbiology, Istanbul Medical Faculty, Istanbul University, Istanbul, Turkey.^e

The antibacterial activity of fosfomycin-tobramycin combination was studied by time-kill assay in eight *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates belonging to the fosfomycin wild-type population (MIC = 64 µg/ml) but with different tobramycin susceptibilities (MIC range, 1 to 64 µg/ml). The mutant prevention concentration (MPC) and mutant selection window (MSW) were determined in five of these strains (tobramycin MIC range, 1 to 64 µg/ml) in aerobic and anaerobic conditions simulating environments that are present in biofilm-mediated infections. Fosfomycin-tobramycin was synergistic and bactericidal for the isolates with mutations in the *mexZ* repressor gene, with a tobramycin MIC of 4 µg/ml. This effect was not observed in strains displaying tobramycin MICs of 1 to 2 µg/ml due to the strong bactericidal effect of tobramycin alone. Fosfomycin presented higher MPC values (range, 2,048 to >2,048 µg/ml) in aerobic and anaerobic conditions than did tobramycin (range, 16 to 256 µg/ml). Interestingly, the association rendered narrow or even null MSWs in the two conditions. However, for isolates with high-level tobramycin resistance that harbored aminoglycoside nucleotidyltransferases, time-kill assays showed no synergy, with wide MSWs in the two environments. *glpT* gene mutations responsible for fosfomycin resistance in *P. aeruginosa* were determined in fosfomycin-susceptible wild-type strains and mutant derivatives recovered from MPC studies. All mutant derivatives had changes in the GlpT amino acid sequence, which resulted in a truncated permease responsible for fosfomycin resistance. These results suggest that fosfomycin-tobramycin can be an alternative for infections due to *P. aeruginosa* since it has demonstrated synergistic and bactericidal activity in susceptible isolates and those with low-level tobramycin resistance. It also prevents the emergence of resistant mutants in either aerobic or anaerobic environments.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for a wide variety of infections. Its high intrinsic and acquired antimicrobial resistance combined with the ability to produce biofilms makes the treatment of these infections a critical challenge (1, 2). Patients with underlying conditions such as cystic fibrosis, obstructive pulmonary disease, and bronchiectasis are particularly vulnerable and usually develop chronic infections. Due to the paucity of new compounds, therapeutic strategies in these situations are based on antimicrobial combinations of already existing antibiotics trying to obtain a synergistic effect (3–5).

Fosfomycin shows no cross-resistance with other antimicrobials, and data suggest that its association with other antipseudomonal agents, such as tobramycin, may be an option for the treatment of infections caused by this pathogen (6, 7). Fosfomycin inhibits bacterial cell wall biosynthesis by inactivating the UDP-*N*-acetylglucosamine-3-*o*-enolpyruvyltransferase. In the case of *P. aeruginosa*, this compound exclusively enters into bacterial cells through the glycerol-3-phosphate nutrient transporter (GlpT) (8). The GlpT protein is an antiporter that belongs to the major facilitator superfamily and consists of 12 transmembrane α -helices (H1 to H12) with two domains each containing a six-helix bundle and connected by a long central loop. It transports across the inner membrane an inorganic phosphate molecule outside the cell, subsequently driving the transport of one molecule of glycerol-3-phosphate into the cell, in both cases against their correspondent concentration gradients (9). Molecular mechanisms implicated in

the inactivation of this permease and consequently in fosfomycin resistance are not widely studied.

However, a fosfomycin and tobramycin combination has been demonstrated to be beneficial, since fosfomycin enhances the active uptake of tobramycin into *P. aeruginosa*, resulting in greater inhibition of protein synthesis, enhanced bacterial killing, and a lower frequency of resistance development (10).

The objectives of this work were to study the *in vitro* activity of a fosfomycin and tobramycin combination against *P. aeruginosa* clinical isolates by time-kill assays and to determine the mutant prevention concentration (MPC) and the mutant selection win-

Received 7 April 2015 Returned for modification 17 May 2015

Accepted 12 July 2015

Accepted manuscript posted online 20 July 2015

Citation Díez-Aguilar M, Morosini MI, Tedim AP, Rodríguez I, Aktaş Z, Cantón R. 2015. Antimicrobial activity of fosfomycin-tobramycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* isolates assessed by time-kill assays and mutant prevention concentrations. Antimicrob Agents Chemother 59:6039–6045. doi:10.1128/AAC.00822-15.

Address correspondence to María Isabel Morosini, mariaisabel.morosini@salud.madrid.org.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00822-15>

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/AAC.00822-15

Antimicrobial Activity of Fosfomycin-Tobramycin Combination against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Assessed by Time-Kill Assays and Mutant Prevention Concentrations

María Díez-Aguilar,^{a,b} María Isabel Morosini,^{a,b} Ana P. Tedim,^{a,c,d} Irene Rodríguez,^{a,c} Zerrin Aktaş,^e Rafael Cantón^{a,b,d}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^a; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^b; CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^c; Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain^d; Department of Clinical Microbiology, Istanbul Medical Faculty, Istanbul University, Istanbul, Turkey.^e

The antibacterial activity of fosfomycin-tobramycin combination was studied by time-kill assay in eight *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates belonging to the fosfomycin wild-type population (MIC = 64 µg/ml) but with different tobramycin susceptibilities (MIC range, 1 to 64 µg/ml). The mutant prevention concentration (MPC) and mutant selection window (MSW) were determined in five of these strains (tobramycin MIC range, 1 to 64 µg/ml) in aerobic and anaerobic conditions simulating environments that are present in biofilm-mediated infections. Fosfomycin-tobramycin was synergistic and bactericidal for the isolates with mutations in the *mexZ* repressor gene, with a tobramycin MIC of 4 µg/ml. This effect was not observed in strains displaying tobramycin MICs of 1 to 2 µg/ml due to the strong bactericidal effect of tobramycin alone. Fosfomycin presented higher MPC values (range, 2,048 to >2,048 µg/ml) in aerobic and anaerobic conditions than did tobramycin (range, 16 to 256 µg/ml). Interestingly, the association rendered narrow or even null MSWs in the two conditions. However, for isolates with high-level tobramycin resistance that harbored aminoglycoside nucleotidyltransferases, time-kill assays showed no synergy, with wide MSWs in the two environments. *glpT* gene mutations responsible for fosfomycin resistance in *P. aeruginosa* were determined in fosfomycin-susceptible wild-type strains and mutant derivatives recovered from MPC studies. All mutant derivatives had changes in the GlpT amino acid sequence, which resulted in a truncated permease responsible for fosfomycin resistance. These results suggest that fosfomycin-tobramycin can be an alternative for infections due to *P. aeruginosa* since it has demonstrated synergistic and bactericidal activity in susceptible isolates and those with low-level tobramycin resistance. It also prevents the emergence of resistant mutants in either aerobic or anaerobic environments.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for a wide variety of infections. Its high intrinsic and acquired antimicrobial resistance combined with the ability to produce biofilms makes the treatment of these infections a critical challenge (1, 2). Patients with underlying conditions such as cystic fibrosis, obstructive pulmonary disease, and bronchiectasis are particularly vulnerable and usually develop chronic infections. Due to the paucity of new compounds, therapeutic strategies in these situations are based on antimicrobial combinations of already existing antibiotics trying to obtain a synergistic effect (3–5).

Fosfomycin shows no cross-resistance with other antimicrobials, and data suggest that its association with other antipseudomonal agents, such as tobramycin, may be an option for the treatment of infections caused by this pathogen (6, 7). Fosfomycin inhibits bacterial cell wall biosynthesis by inactivating the UDP-*N*-acetylglucosamine-3-*O*-enolpyruvyltransferase. In the case of *P. aeruginosa*, this compound exclusively enters into bacterial cells through the glycerol-3-phosphate nutrient transporter (GlpT) (8). The GlpT protein is an antiporter that belongs to the major facilitator superfamily and consists of 12 transmembrane α -helices (H1 to H12) with two domains each containing a six-helix bundle and connected by a long central loop. It transports across the inner membrane an inorganic phosphate molecule outside the cell, subsequently driving the transport of one molecule of glycerol-3-phosphate into the cell, in both cases against their correspondent concentration gradients (9). Molecular mechanisms implicated in

the inactivation of this permease and consequently in fosfomycin resistance are not widely studied.

However, a fosfomycin and tobramycin combination has been demonstrated to be beneficial, since fosfomycin enhances the active uptake of tobramycin into *P. aeruginosa*, resulting in greater inhibition of protein synthesis, enhanced bacterial killing, and a lower frequency of resistance development (10).

The objectives of this work were to study the *in vitro* activity of a fosfomycin and tobramycin combination against *P. aeruginosa* clinical isolates by time-kill assays and to determine the mutant prevention concentration (MPC) and the mutant selection win-

Received 7 April 2015 Returned for modification 17 May 2015

Accepted 12 July 2015

Accepted manuscript posted online 20 July 2015

Citation Díez-Aguilar M, Morosini MI, Tedim AP, Rodríguez I, Aktaş Z, Cantón R. 2015. Antimicrobial activity of fosfomycin-tobramycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* isolates assessed by time-kill assays and mutant prevention concentrations. Antimicrob Agents Chemother 59:6039–6045. doi:10.1128/AAC.00822-15.

Address correspondence to María Isabel Morosini, mariaisabel.morosini@salud.madrid.org.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00822-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/AAC.00822-15



Capítulo 3

CAPÍTULO 3º

“ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* MEDIANTE DIFERENTES MODELOS *IN VITRO* Y EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE FOSFOMICINA Y TOBRAMICINA EN LA PREVENCIÓN E INHIBICIÓN DE LAS MISMAS”

CAPÍTULO 3º:**ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* MEDIANTE DIFERENTES MODELOS *IN VITRO* Y EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE FOSFOMICINA Y TOBRAMICINA EN LA PREVENCIÓN E INHIBICIÓN DE LAS MISMAS.****1-OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 3º.**

Muchas infecciones transcurren con la formación de biopelículas, entre ellas la infección broncopulmonar crónica por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística. A la hora de evaluar la actividad *in vitro* de los antibióticos en este tipo de infecciones, es importante utilizar modelos que reproduzcan el crecimiento en *biofilm*, ya que muchos antimicrobianos presentan reducida su actividad en estas condiciones. Existen varios métodos que permiten la formación de biopelículas *in vitro*, sin embargo no se ha llegado a un consenso sobre cuál es la mejor opción, y la comparación entre estudios es difícil.

Los objetivos en este capítulo fueron:

- Establecer, mediante un **modelo cerrado**, las condiciones para la formación de *biofilm* y una vez logrado, determinar la actividad de la fosfomicina y de la tobramicina, así como de su combinación a distintas concentraciones, en varios aislados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística. Determinar parámetros farmacodinámicos y coeficientes de sinergia.
- Obtener *biofilms* mediante un **modelo abierto**, estudiar la dinámica de su formación mediante la observación al microscopio. Determinar la actividad de fosfomicina, tobramicina y de su combinación en los *biofilms* formados con este método.
- Comparar los resultados obtenidos con ambos métodos y establecer la posible complementariedad, ventajas e inconvenientes de los modelos utilizados.

2-MATERIAL Y MÉTODOS

2.1- Cepas estudiadas

Cepa control

En los estudios de sensibilidad se utilizó como control la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Cepas clínicas

Se utilizaron 6 cepas clínicas de *P. aeruginosa* procedentes de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística. Todas ellas eran sensibles a tobramicina y fosfomicina. Las cepas representaban morfotipos diversos, incluyendo el tipo mucoso. Dos de ellas fueron aislados de primoinfecciones y el resto de las cepas pertenecían a pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa*. Las características de estos aislados están recogidas en la **Tabla 15**:

AISLADO	MORFOTIPO	CMI FOSFOMICINA (mg/l)	CMI TOBRAMICINA (mg/l)	INFECCIÓN	Edad
<i>Pab1</i>	MUCOSA	64	1	Primoinfección	21
<i>Pab2</i>	ENTEROBACTERIA	64	1	Primoinfección	15
<i>Pab3</i>	ENTEROBACTERIA	64	2	Crónica	45
<i>Pab4</i>	MUCOSA	64	1	Crónica	22
<i>Pab5</i>	ENTEROBACTERIA	64	4	Crónica	22
<i>Pab6</i>	PUNTIFORME	64	4	Crónica	26
ATCC 27853	-	4	0.5	-	-

Tabla 15: Características de los aislados utilizados para los ensayos de formación de biofilm

2.2-Determinación de la actividad de fosfomicina, tobramicina y de la combinación fosfomicina-tobramicina sobre biopelículas de *P. aeruginosa* mediante el modelo *in vitro* de CALGARY.

El modelo de *Calgary*, descrito en la introducción, es un dispositivo cerrado y estático mediante el que se puede medir la actividad de un antimicrobiano sobre una biopelícula formada por un microorganismo. Con este sistema se pueden calcular varios **parámetros farmacodinámicos**, que permiten la determinación de dicha actividad:

- **Concentración mínima inhibitoria del biofilm (CMIB)**
- **Concentración mínima que erradica el biofilm (CMEB)**
- **Concentración mínima bactericida del biofilm (CMBB)**

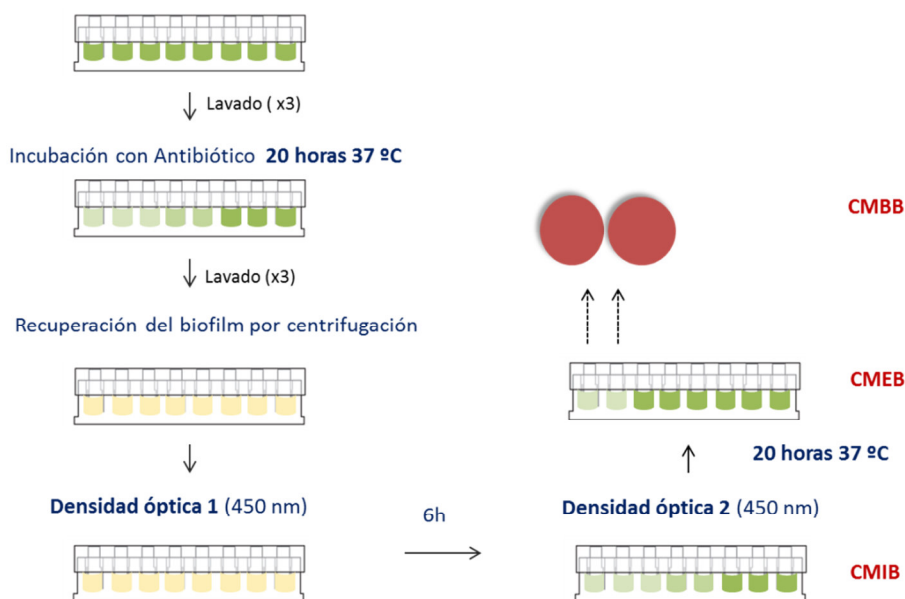
Formación de biofilm (inóculo + MHB) 20 horas 37 °C

Figura 39: Esquema del procedimiento seguido para la determinación de la actividad de un antibiótico sobre biofilm con el método CALGARY (adaptado de Moskowitz et al.)

Para llevar a cabo este modelo se siguió el método descrito por Moskowitz et al. (69) (**Figura 39**): para ello se inoculó una colonia aislada de una placa de agar sangre en 10 ml de medio de cultivo líquido LB y se incubó con agitación durante 16 horas a 37°C. Tras este tiempo, el caldo (inóculo) se diluyó hasta una concentración final equivalente al 0.5 McFarland. 100 µl fueron transferidos a todos los pocillos de la placa de microdilución (Nunc International, Rochester, N.Y.), exceptuando el del control negativo.

Sobre esta placa se colocó una tapa con pinchos de poliestireno (Nunc TSP system) alrededor de los cuales se formó el *biofilm* durante 20 horas a 37°C. Después de este tiempo los pinchos se lavaron 3 veces en agua estéril y se colocaron en una placa de microdilución con 100 µl de caldo Muller-Hinton con las diferentes diluciones del antibiótico (**Figura 40**), seguido de una incubación durante 20 horas a 37°C. Los pinchos se lavaron nuevamente 3 veces con agua estéril y se colocaron en una nueva placa de microdilución inoculada con 100 µl de caldo Muller-Hinton en cada pocillo.

Esta placa se centrifugó durante 10 minutos a 800 rpm para depositar la biopelícula adherida al pincho en el pocillo. Tras la centrifugación se desechó la tapa y se midió por espectrofotometría (Flow Titertek Multiskan Plus, Flor Laboratorios, Finlandia) la densidad óptica (DO) del cultivo a una longitud de onda de 450 nm.

Posteriormente se incubó durante 6 horas a 37°C y se midió nuevamente la DO. Se determinaron las diferencias de los valores de DO a tiempo 0 y tras las 6 horas de incubación. Se consideró que el aislado era capaz de formar un *biofilm* cuando la diferencia entre ambas DO [DO (6 horas)-DO (0 horas)] en el control positivo era ≥ 0.05 .

La **CMIB** fue definida como la concentración más baja de antimicrobiano que produjo una diferencia de DO a las 6 horas igual o menor al 10% del valor de la DO del control positivo. Si este porcentaje era menor que la DO obtenida en el control negativo, se utilizó este último valor como referencia para el cálculo de la CMIB.

La **CMIB** indica la concentración más baja de antimicrobiano con la que no hay un incremento tiempo-dependiente del número de células viables en el *biofilm* al comparar una exposición temprana con una exposición más tardía.

Así mismo, este sistema permite el cálculo de la **CMEB**, que es la concentración más baja requerida para erradicar un *biofilm*, es decir, para inhibir el crecimiento visible en el medio utilizado para recuperar el *biofilm*.

La **CMBB** se define como la concentración más baja de antibiótico que provoca la muerte (actividad bactericida) del 99% de las células crecidas en forma de *biofilm*, en comparación con el control positivo.

Para el cálculo de estos parámetros se utilizaron diferentes concentraciones de fosfomicina (2-1024 mg/l), tobramicina (0,5-64 mg/l) y de la combinación de ambos compuestos. En la **Figura 40** se detalla el esquema de la placa de microtitulación con las distintas concentraciones utilizadas.

Fosfomicina											Tobramicina	Controles
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	64	C+
F/T32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	32	C+
F/T16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	16	C+
F/T8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	8	C+
F/T4	512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	4	C-
F/T2	512/2	256/2	128/2	64/2	32/2	16/2	8/2	4/2	2/2	1/2	2	C-
F/T1	512/1	256/1	128/1	64/1	32/1	16/1	8/1	4/1	2/1	1/1	1	C-
F/T0.5	512/0.5	256/0.5	128/0.5	64/0.5	32/0.5	16/0.5	8/0.5	4/0.5	2/0.5	1/0.5	0.5	C-

Figura 40: Esquema la placa de microtitulación utilizada con el método Calgary. Se utilizó un gradiente de concentración de fosfomicina de 2- 1024 mg/l, de tobramicina de 0.5- 32 mg/l y de la combinación fosfomicina (1- 512 mg/l)/tobramicina (0.5-32 mg/l). En color naranja se representan las concentraciones de la combinación de fosfomicina-tobramicina con una proporción de 4:1. Así mismo se dejaron pocillos para controles positivos (sin antibiótico) y negativos (sin inóculo bacteriano).

Para determinar si la combinación de fosfomicina y tobramicina era sinérgica con cada concentración fija de tobramicina se determinó la **Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF)** utilizando el método del tablero de ajedrez (130) adaptado a la **CMIB** mediante la siguiente fórmula:

$$\Sigma \text{CIF} = \frac{\text{CMIB}(\text{Tc})}{\text{CMIB}(\text{T})} + \frac{\text{CMIB}(\text{Fc})}{\text{CMIB}(\text{F})}$$

La **CMIB(T)** representa la concentración de tobramicina necesaria para inhibir el *biofilm* y la **CMIB(Tc)** la concentración de tobramicina necesaria para inhibir el *biofilm* en combinación con fosfomicina. Con la fracción de ambos parámetros se calculó la CIF de tobramicina.

La **CMIB(F)** representa la concentración de fosfomicina necesaria para inhibir el *biofilm* y la **CMIB(Fc)**, la concentración de fosfomicina necesaria para inhibir el *biofilm* en combinación con tobramicina. Del mismo modo, se calculó la CIF para fosfomicina y ambas se sumaron obteniendo la CIF de la combinación.

Se consideró que hubo sinergia cuando $\Sigma \text{CIF} \leq 0.5$ y antagonismo cuando la $\Sigma \text{CIF} > 4$. Los valores ligeramente superiores a 0.5 indican un cambio de 2 diluciones en la CMIB para uno de los antibióticos y un cambio mayor en la CMIB del otro antibiótico (131,132).

Este sistema *in vitro* para determinación de la actividad sobre biopelículas también permite determinar la **concentración que previene la aparición de biofilm (CPB)** mediante una modificación del protocolo anterior, descrito por Fernández-Olmos *et al.* (133). En este caso, el inóculo y las diluciones de antibiótico se incuban simultáneamente y a partir de este paso el procedimiento a seguir es similar al anterior. Se determina la DO a las 0 horas y 6 horas de incubación y se obtiene la **CPB** calculando aquella concentración con la que se obtenga una DO menor o igual al 10% de la DO del control positivo (**Figura 41**).

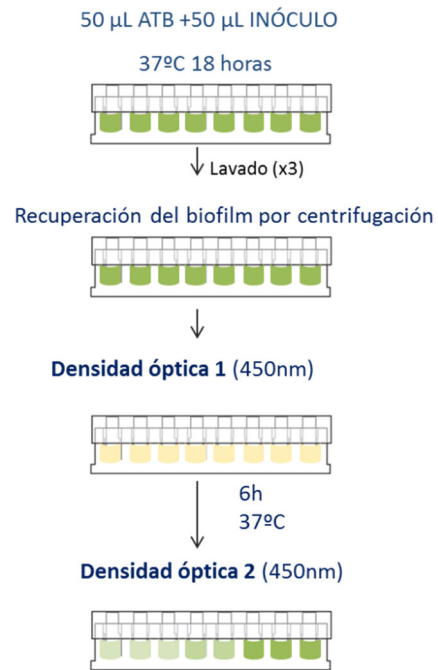


Figura 41: Esquema seguido para la determinación de la concentración preventiva de aparición de biofilm.

2.3-Determinación de la actividad de fosfomicina, tobramicina y de la combinación fosfomicina-tobramicina sobre biopelículas de *P. aeruginosa* con el sistema de microfluídica BIOFLUX.

Para la formación de las biopelículas con el sistema Bioflux (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA), se utilizaron placas de 48 pocillos con capacidad para realizar 24 ensayos (Figura 42). Se siguió un protocolo adaptado del descrito por Benoit *et al.* (72).

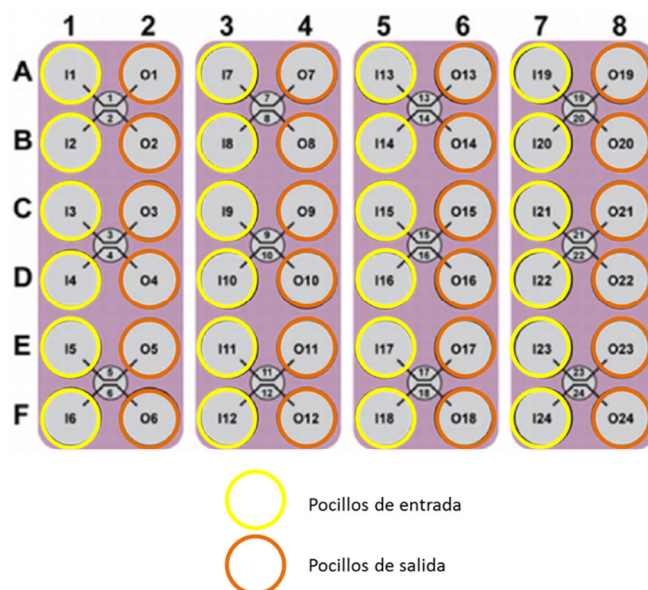


Figura 42: Esquema de la placa de 48 pocillos de BIOFLUX utilizada para la formación de 24 biopelículas.

Se procedió al **llenado de los microcanales** con 100 μl de medio LB en los pocillos de entrada y aplicando una fuerza de flujo de 1 dina/cm^2 durante 5 minutos (111 $\mu\text{l/hora}$). Posteriormente se procedió a la **fijación de las células** al canal añadiendo a los pocillos de salida 20 μl de la suspensión de inóculo bacteriano obtenido durante la incubación en medio líquido LB durante 16 horas a 37°C y ajustado a una concentración aproximada de 10^8 - 10^9 UFC/ml. Se aplicó una fuerza de flujo de 2 dinas/cm^2 durante 5 segundos (223 $\mu\text{l/hora}$) y se incubó durante 2 horas a 37°C . Transcurrido este tiempo, la **formación del biofilm** se consiguió aplicando una fuerza de 0.15 dina/cm^2 durante 8 horas a 37°C (17 $\mu\text{l/hora}$). Una vez formado el *biofilm* se procedió a la adición en los pocillos de entrada **del antibiótico** disuelto en medio Muller-Hinton, incubándose durante 18 horas a 37°C con una fuerza de 0.15 dinas/cm^2 (Tabla 16).

En cada ensayo se utilizó un control negativo sin antibiótico ni inóculo y un control positivo con el inóculo bacteriano pero sin antibiótico. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Para evitar la aparición de burbujas que bloqueen el flujo en los microcanales, los medios utilizados se precalentaron a una temperatura similar a la de incubación y la temperatura exterior se intentó asemejar a la del ensayo. La placa se observó con un microscopio invertido (**Celeromics Technologies SRL**, Spain) con el objetivo de 20 X y las imágenes se tomaron con una cámara Samsung CMOS 16MP 28mm.

Proceso	Fuerza (dina/cm ²)	Presión (psi)	Temperatura	Tiempo
Llenado de microcanales	1	0.4	Tª ambiente	5 minutos
Fijación de las células (I)	2	0.8	Tª ambiente	5 segundos
Fijación de las células (II)	-		37°C	2 horas
Formación de biopelícula	0.15	0.06	37°C	8 horas
Incubación con antibiótico	0.15	0.06	37°C	18 horas

Tabla 16: Esquema del protocolo seguido para la formación de biopelículas con el sistema BIOFLUX

El tiempo de incubación para la formación del *biofilm* se fijó en 8 horas, siempre y cuando, en este momento, se hubiera formado aproximadamente el 40% del total del *biofilm* (calculado mediante un ensayo anterior para determinar la dinámica de formación del *biofilm*). Si en este tiempo la cantidad de *biofilm* formado era menor, se mantenía el crecimiento hasta llegar a este porcentaje.

El análisis de los resultados se realizó con el *software* proporcionado por el sistema *Bioflux 200*, cuantificando la intensidad de la imagen por píxeles de color en una escala de grises de 8 bits, considerando en cada ensayo la intensidad máxima (*I_{max}*) la obtenida en el pocillo del control de inóculo y la intensidad mínima (*I_{min}*) la obtenida en el control negativo.

Los resultados se expresaron gráficamente como el porcentaje de biopelícula remanente tras la incubación con el antibiótico, utilizando la fórmula:

$$\text{Porcentaje de biofilm} = \left[\frac{I_{\max} - X}{I_{\min} - I_{\max}} \bullet 100 \right] + 100$$

Siendo X la intensidad obtenida en el pocillo de la muestra a analizar. -

Las concentraciones de antibiótico ensayadas para cada aislado fueron las correspondientes a: -

- La **CMI de tobramicina**
- La **CMIB de tobramicina** obtenida por el método *Calgary*
- La **CMI de fosfomicina**
- La **CMIB de fosfomicina** obtenida por el método *Calgary*
- La **CMIB de la combinación fosfomicina-tobramicina** con la que se obtuvo sinergia con el método *Calgary*, considerando la menor concentración de tobramicina.



Figura 43: Sistema Bioflux, utilizado para los experimentos abiertos de formación de biopelículas. Consta de un compresor de aire y reguladores electroneumáticos controlados por un software integrado. La biopelícula se forma en una placa adaptada a un incubador a 37°C y la observación del biofilm se realiza utilizando un microscopio invertido.

Para determinar las diferencias entre el *biofilm* producido en el canal del inóculo y en los canales con los antibióticos y sus combinaciones, se analizaron los datos de intensidad con el test no paramétrico de Mann–Whitney, considerando significativo un valor de $p < 0.01$. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico STATA para Windows versión 11.0.

3-RESULTADOS

3.1-Resultados obtenidos con el sistema cerrado *CALGARY*

Utilizando el método de *Calgary* se demostró que todos los aislados, excepto el aislado *Pab6*, eran capaces de formar *biofilm*. Se obtuvo una diferencia de DO entre las 6 y las 0 horas ≥ 0.05 para *Pab1-Pab5*, incluyendo la cepa ATCC 27853, mientras que para *Pab6* fue de 0.008. Para cada aislado, la cantidad de *biofilm* formado reflejado por esta diferencia de DO (ΔDO) se puede ver representado en la **Figura 44**.

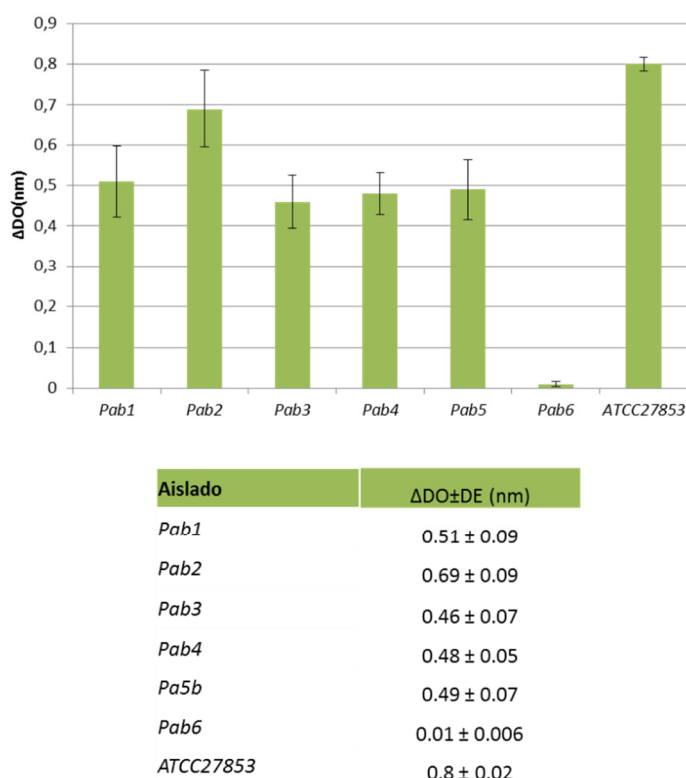


Figura 44: Diferencia de DO (ΔDO) \pm la desviación estándar (DE) medidas a 450 nm obtenidas para cada aislado

En los aislados clínicos, las **CMIB obtenidas para fosfomicina** fueron de 1024->1024 mg/l y el rango de **CMIB para tobramicina** fue de 8-32 mg/l. Para la cepa control ATCC 27853 la CMIB de tobramicina fue de 2 mg/l y para fosfomicina de 1024 mg/l.

En la **Figura 45** se pueden observar las CMIB de fosfomicina (fila azul), de tobramicina (columna morada), así como las CMIB de las combinaciones de fosfomicina-tobramicina para cada concentración fija de tobramicina, representadas en color amarillo (filas). Así mismo, en color naranja se han marcado las concentraciones con una proporción 4:1, que ha demostrado

mayor actividad en trabajos anteriormente publicados (13). Se puede observar que ningún valor de CMIB coincidió con esta proporción.

Pab1											Tobramicina Control	
Fosfomicina	>1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	64	C+
F/T16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	<1/16	16	C+
F/T8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	<1/8	8	C+
F/T4	>512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	4	C+
F/T2	>512/2	256/2	128/2	64/2	32/2	16/2	8/2	4/2	2/2	1/2	2	C-
F/T1	512/1	256/1	128/1	64/1	32/1	16/1	8/1	4/1	2/1	1/1	1	C-
Pab2											Tobramicina Control	
Fosfomicina	>1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	64	C+
F/T32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	32	C+
F/T16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	<1/16	16	C+
F/T8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	8	C+
F/T4	>512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	4	C-
F/T2	>512/2	256/2	128/2	64/2	32/2	16/2	8/2	4/2	2/2	1/2	2	C-
Pab3											Tobramicina Control	
Fosfomicina	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	64	C+
F/T32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	32	C+
F/T16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	<1/16	16	C+
F/T8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	8	C+
F/T4	512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	4	C-
F/T2	512/2	256/2	128/2	64/2	32/2	16/2	8/2	4/2	2/2	1/2	2	C-
Pab4											Tobramicina Control	
Fosfomicina	>1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	64	C+
F/T16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	<1/16	32	C+
F/T8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	<1/8	16	C+
F/T4	512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	<1/4	8	C+
F/T2	>512/2	256/2	128/2	64/2	32/2	16/2	8/2	4/2	2/2	1/2	4	C-
F/T1	>512/1	256/1	128/1	64/1	32/1	16/1	8/1	4/1	2/1	1/1	2	C-
Pab5											Tobramicina Control	
Fosfomicina	>1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	64	C+
F/T16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	<1/16	32	C+
F/T8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	16	C+
F/T4	512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	8	C+
F/T2	>512/2	256/2	128/2	64/2	32/2	16/2	8/2	4/2	2/2	1/2	4	C-
F/T1	>512/1	256/1	128/1	64/1	32/1	16/1	8/1	4/1	2/1	1/1	2	C-
ATCC											Tobramicina Control	
Fosfomicina	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	32	C+
F/T8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	<1/8	16	C+
F/T4	512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	<1/4	8	C+
F/T2	512/2	256/2	128/2	64/2	32/2	16/2	8/2	4/2	2/2	1/2	4	C+
F/T1	512/1	256/1	128/1	64/1	32/1	16/1	8/1	4/1	2/1	1/1	2	C-
F/T0.5	512/0.5	256/0.5	128/0.5	64/0.5	32/0.5	16/0.5	8/0.5	4/0.5	2/0.5	1/0.5	1	C-

Figura 45: Esquema en el que se representan las CMIB de fosfomicina, tobramicina y la combinación fosfomicina-tobramicina (color amarillo).

Para analizar qué combinaciones presentaban sinergia se calculó el **índice CIF**. Los resultados se pueden observar en la **Tabla 17**. En verde se representa la concentración más baja de tobramicina en combinación, que tuvo sinergia y que posteriormente se utilizó para los estudios en el modelo abierto *BIOFLUX*. Como se puede observar, todos los aislados presentaron sinergia para una o más concentraciones antibióticas (CIF ≤ 0.5), excepto la cepa ATCC 27853 con la que no se obtuvo sinergia con ninguna de las concentraciones ensayadas.

Tobramicina (mg/l)	ΣCIF Pab1	ΣCIF Pab2	ΣCIF Pab3	ΣCIF Pab4	ΣCIF Pab5	ΣCIF ATCC
16	1	0.5	0.5			
8	1	0.375(128/8)*	0.265		0.625	
4	0.75	1.125	0.156		0.5(256/4)*	
2	0.5	1.06	0.125(64/2)*	0.562		
1	0.375(256/1)*	.	.	0.5(256/1)*		0.562
0.5						0.75

Tabla 17: Resultados de CIF de la combinación de fosfomicina-tobramicina para cada concentración fija de tobramicina. En verde se representa la concentración más baja de tobramicina con la que se obtuvo sinergia. *Concentración de la combinación de fosfomicina/tobramicina (mg/l)

Respecto a los **parámetros de CMEB y CMBB**, los resultados están recogidos en la **Tabla 18**. Tanto para la tobramicina como para la combinación, los valores de dichos parámetros fueron mayores que los de las CMIB. **En los aislados clínicos**, la CMEB y la CMBB de fosfomicina fueron de 1024->1024 mg/l. Para la tobramicina, los valores de CMEB presentaron un rango de 64-512 mg/l y de CMBB de 128->512 mg/l.

	FOSFOMICINA/TOBRAMICINA (mg/l)											
	FOSFOMICINA (mg/l)	TOBRAMICINA (mg/l)		T1	T2	T4	T8	T16	T32	T64	T128	T256
Pab1	>1024	64	CMEB	>1204	>1024	512	1024	1024	128	<2	-	-
	>1024	256	CMBB	>1204	>1024	512	1024	1024	128	<2	-	-
Pab2	>1024	128	CMEB	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	<2	-	-
	>1024	128	CMBB	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	128	-	-
Pab3	1024	512	CMEB	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	<2
	1024	>512	CMBB	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	<2
Pab4	>1024	128	CMEB	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	<2	<2	<2
	>1024	128	CMBB	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	<2	<2	<2
Pa5b	>1024	256	CMEB	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	<2
	>1024	256	CMBB	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	>1204	<2
ATCC	1024	8	CMEB	512	512	256	<1	-	-	-	-	-
	1024	8	CMBB	512	512	256	<1	-	-	-	-	-

Tabla 18: Valores de CMEB y CMBB obtenidos para la fosfomicina y la tobramicina (parte izquierda de la tabla) y para las combinaciones (parte derecha de la tabla)

Para la cepa **ATCC 27853**, la CMEB y la CMBB fueron idénticas, fosfomicina 1024 mg/l y tobramicina 8 mg/l.

En el caso de las combinaciones de fosfomicina-tobramicina (parte derecha de la tabla) no se obtuvo ventaja al asociar con fosfomicina, ya que las CMEB y CMBB fueron similares a las de la tobramicina en solitario.

Respecto al **parámetro de CPB**, para **tobramicina** se obtuvo un valor ≤ 1 mg/l en todos los aislados, incluso en aquellos que tenían CMI's más elevadas de tobramicina (*Pab3* CMI-tobramicina= 2 mg/l, y *Pab5* CMI-tobramicina= 4 mg/l), obteniendo por tanto índices de CPB/CMI menores a 1. La CPB de tobramicina para la cepa ATCC 27853 fue ≤ 0.5 mg/l.

Para la **fosfomicina** sin embargo, aunque todos los aislados tenían aproximadamente la misma CMI (64 mg/l), este índice fue desde 1-32. Esto significa que para *Pab1*, *Pab4* y *Pab5*, la CPB fue igual o cercana a su CMI, mientras que para otros como *Pab3* o *Pab2*, la CPB fue de 3 y hasta 5 diluciones más alta, respectivamente (**Tabla 19**). La CPB de fosfomicina para la cepa ATCC 27853 fue cercana a su CMI, 8 mg/l.

Las CPBs para todas las **combinaciones de fosfomicina/tobramicina** ensayadas resultaron también en una concentración de tobramicina ≤ 1 mg/l, lo que concluye que tobramicina es un antimicrobiano que previene por sí solo la formación del *biofilm*.

AISLADO	CPB TOBRA	CPB/CMI TOBRA	CPB FOSFO	CPB/CMI FOSFO
<i>Pab1</i>	≤ 1	1	128	2
<i>Pab2</i>	≤ 1	1	>1024	32
<i>Pab3</i>	≤ 1	0.5	512	8
<i>Pab4</i>	≤ 1	1	64	1
<i>Pab5</i>	≤ 1	0.25	64	1
ATCC 27853	≤ 0.5	1	8	2

Tabla 19: CPB e índices CPB/CMI obtenidos para cada aislado.

3.2-Resultados obtenidos con el sistema abierto *BIOFLUX*

Con este modelo se observó que todos los aislados eran capaces de crecer formando *biofilm*, excepto el aislado *Pab6* para el que, a las 24 horas, no se observó microscópicamente, ninguna biopelícula o agregación en el microcanal (**Figura 51**). Esta observación coincide con la obtenida en el sistema cerrado de *Calgary*.

Para los aislados *Pab1-Pab4* y la cepa ATCC 27853, el porcentaje de *biofilm* formado a las 8 horas fue desde 37-59.7%. Sin embargo, para el aislado *Pab5* el porcentaje de *biofilm* formado a las 8 horas fue de 7.1%. La incubación por tanto de este aislado se mantuvo 24 horas, hasta que se formó un 40.1% del *biofilm*, momento en el cual se añadieron los antibióticos (**Tabla 20**).

AISLADO	% <i>Biofilm</i> 8 horas	% <i>Biofilm</i> 24 horas	% <i>Biofilm</i> 48 horas
<i>Pab1</i>	48	100	-
<i>Pab2</i>	37	100	-
<i>Pab3</i>	42.4	100	-
<i>Pab4</i>	59.7	100	-
<i>Pab5</i>	7.1	40.1	100
ATCC	40.9	100	-

Tabla 20: Porcentaje de *biofilm* formado por cada cepa en los tiempos establecidos

Considerando el total de los aislados, según el análisis estadístico de **Mann–Whitney**, hubo diferencias estadísticamente significativas entre el *biofilm* formado en el canal del inóculo (control), y en aquellos en los que se añadió fosfomicina, tobramicina y la combinación de ambos a una concentración igual a la CMIB ($p < 0.01$). Sin embargo, no hubo diferencias entre el *biofilm* formado en el canal del inóculo y en el que se añadió tobramicina y fosfomicina a una concentración igual a la CMI de la bacteria ($p > 0.01$) (**Tabla 21**).

	FOSFOMICINA CMI	TOBRAMICINA CMI	FOSFOMICINA CMIB	TOBRAMICINA CMIB	FOSFO-TOBRA CMIB
p	0.0374	0.0547	0.0039	0.0065	0.0062

Tabla 21: Valor de *p* obtenido para cada antibiótico según el test de Mann–Whitney.

A continuación se detallan los resultados obtenidos individualmente para cada aislado. En ellos se refleja la intensidad media medida en el microcanal, así como la DE calculada con una medida de las zonas de máxima intensidad para manifestar los acúmulos de *biofilm* en aquellos casos donde existiera.

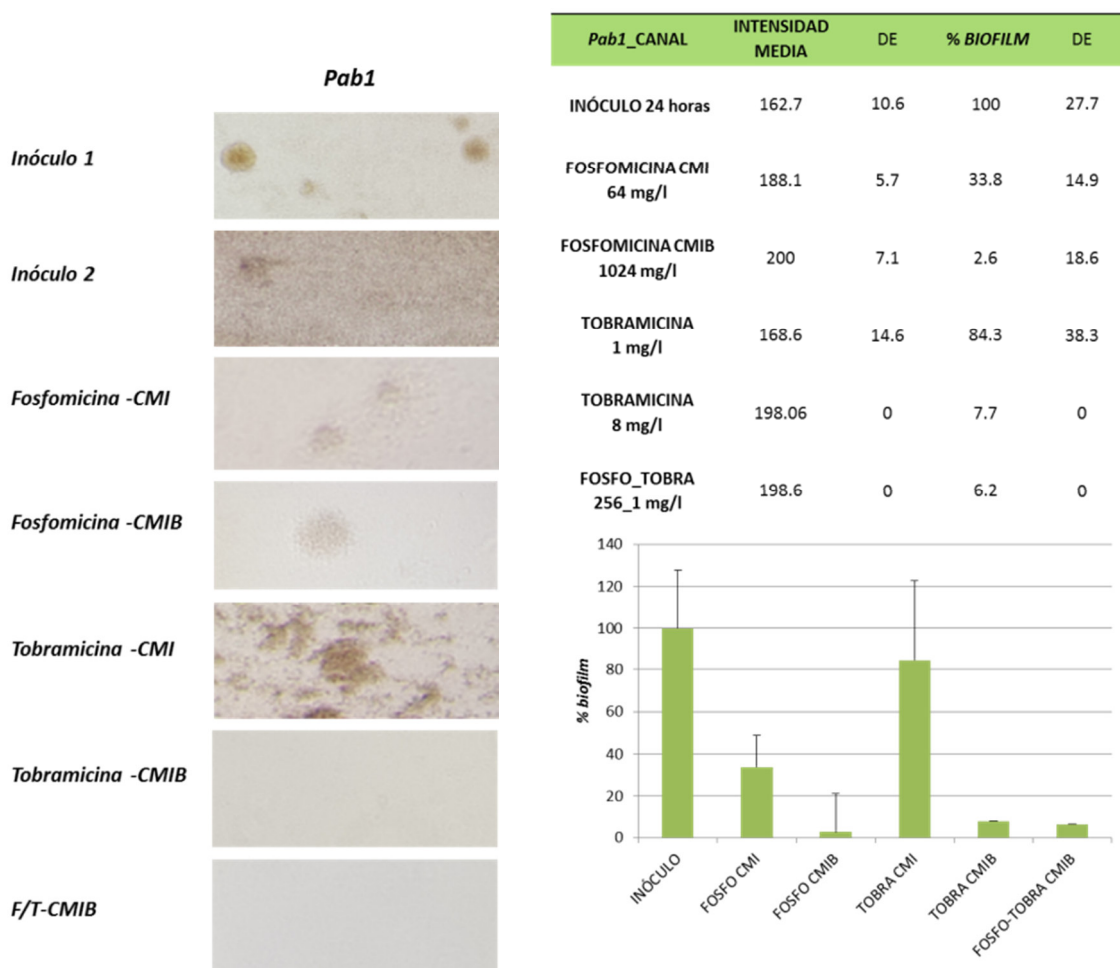
3.2.1 RESULTADOS PARA EL AISLADO *Pab1*

Figura 46: En la parte izquierda de la figura se muestra la imagen tomada para cada microcanal del aislado *Pab1*. El inóculo 1 corresponde al observado a las 8 horas y el inóculo 2 el observado a las 24 horas. En la tabla se muestran los resultados de la intensidad media para cada experimento y su correspondiente porcentaje de biofilm remanente. En la parte inferior se muestra la representación gráfica de este porcentaje. La desviación estándar (DE) se ha calculado teniendo en cuenta las zonas de intensidad máxima dentro del microcanal.

3.2.2 RESULTADOS PARA EL AISLADO Pab2

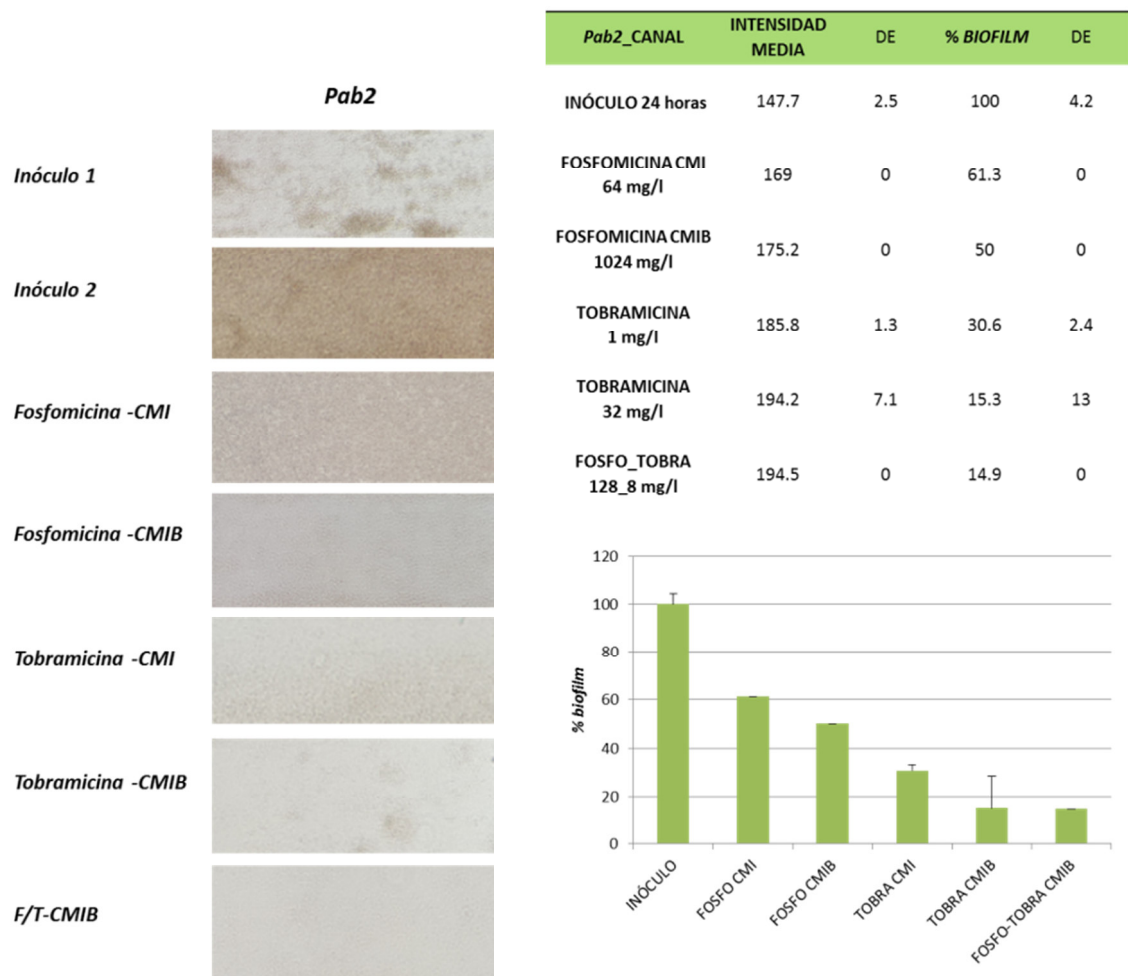


Figura 47: En la parte izquierda de la figura se muestra la imagen tomada para cada microcanal del aislado Pab2. El inóculo 1 corresponde al observado a las 8 horas y el inóculo 2 el observado a las 24 horas. En la tabla se muestran los resultados de la intensidad media para cada experimento y su correspondiente porcentaje de biofilm remanente. En la parte inferior se muestra la representación gráfica de este porcentaje. La desviación estándar (DE) se ha calculado teniendo en cuenta las zonas de intensidad máxima dentro del microcanal.

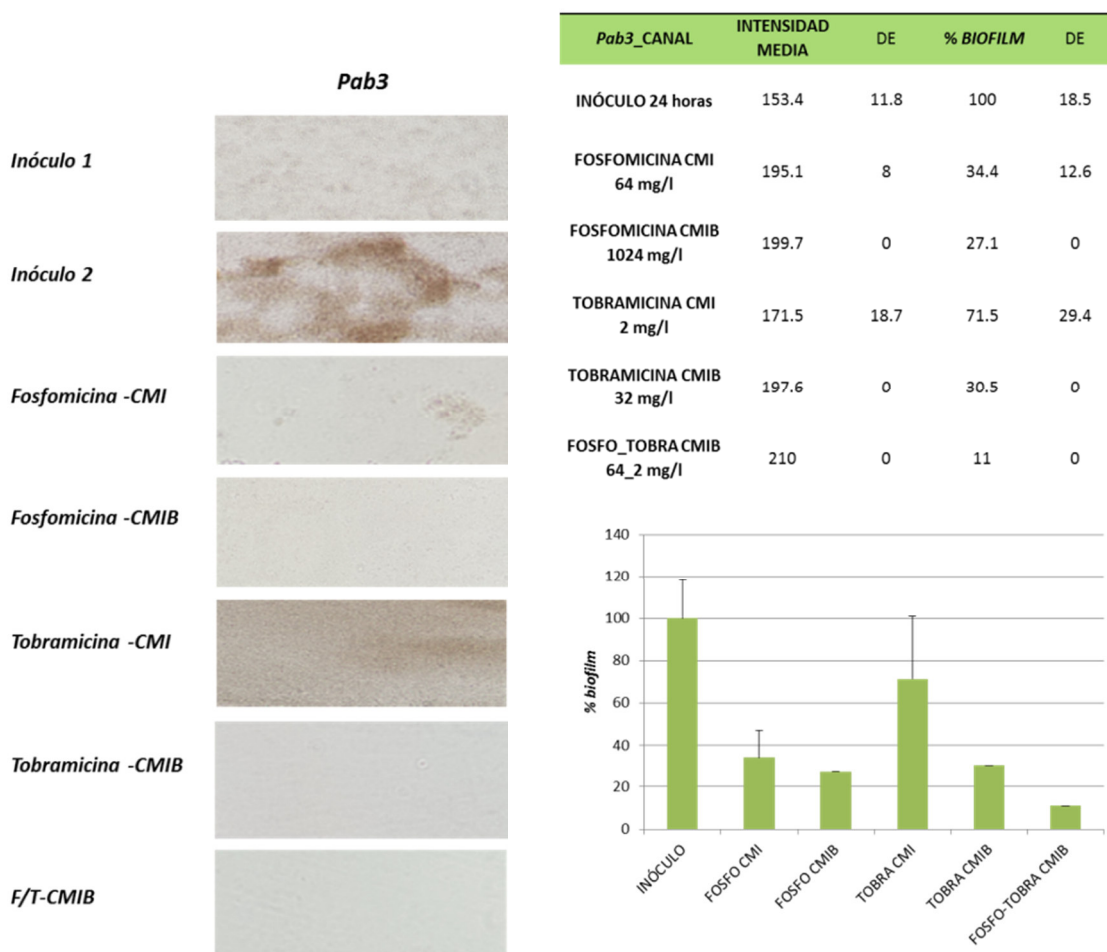
3.2.3-RESULTADOS PARA EL AISLADO *Pab3*

Figura 48: En la parte izquierda de la figura se muestra la imagen tomada para cada microcanal del aislado *Pab3*. El inóculo 1 corresponde al observado a las 8 horas y el inóculo 2 el observado a las 24 horas. En la tabla se muestran los resultados de la intensidad media para cada experimento y su correspondiente porcentaje de biofilm remanente. En la parte inferior se muestra la representación gráfica de este porcentaje. La desviación estándar (DE) se ha calculado teniendo en cuenta las zonas de intensidad máxima dentro del microcanal.

3.2.4-RESULTADOS PARA EL AISLADO Pab4

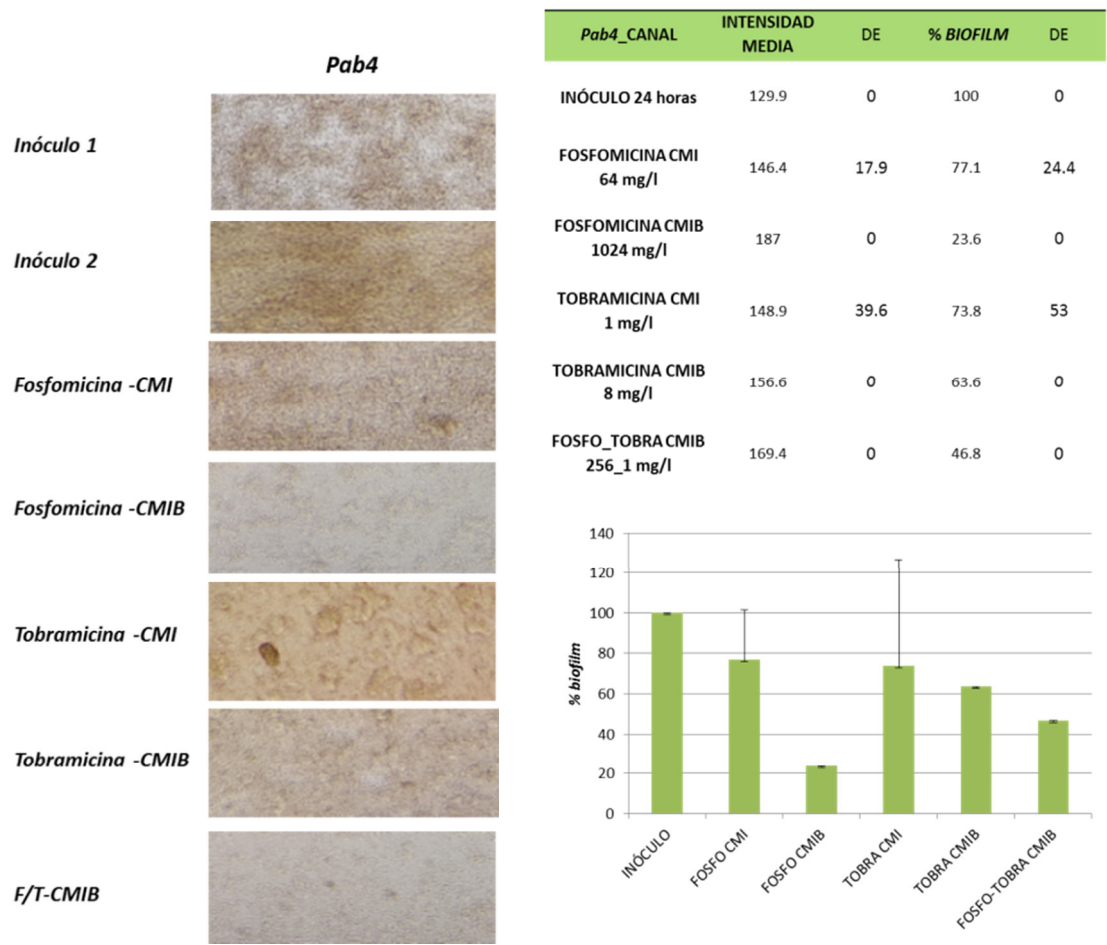


Figura 49: En la parte izquierda de la figura se muestra la imagen tomada para cada microcanal del aislado Pab4. El inóculo 1 corresponde al observado a las 8 horas y el inóculo 2 el observado a las 24 horas. En la tabla se muestran los resultados de la intensidad media para cada experimento y su correspondiente porcentaje de biofilm remanente. En la parte inferior se muestra la representación gráfica de este porcentaje. La desviación estándar (DE) se ha calculado teniendo en cuenta las zonas de intensidad máxima dentro del microcanal.

3.2.5-RESULTADOS PARA EL AISLADO Pab5

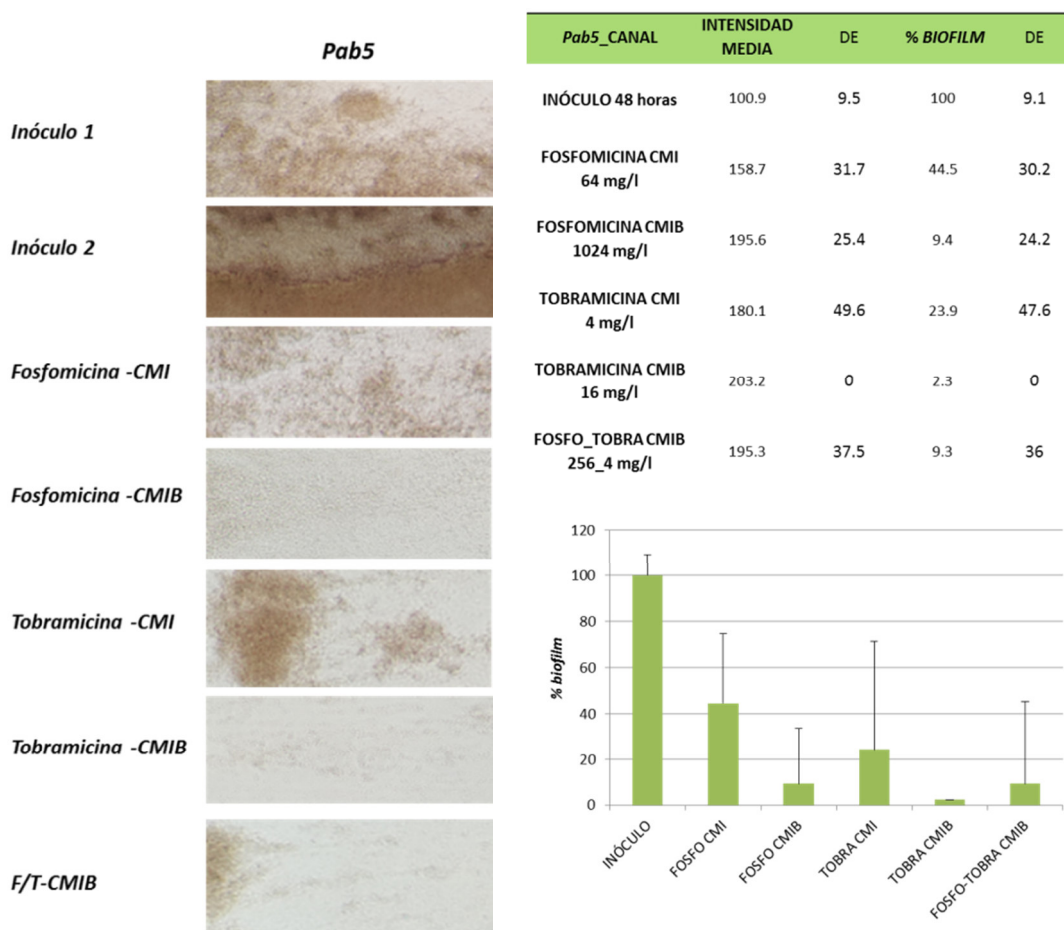


Figura 50: En la parte izquierda de la figura se muestra la imagen tomada para cada microcanal del aislado Pab5. El inóculo 1 corresponde al observado a las 24 horas y el inóculo 2 el observado a las 48 horas. En la tabla se muestran los resultados de la intensidad media para cada experimento y su correspondiente porcentaje de biofilm remanente. En la parte inferior se muestra la representación gráfica de este porcentaje. La desviación estándar (DE) se ha calculado teniendo en cuenta las zonas de intensidad máxima dentro del microcanal.

3.2.6-RESULTADOS PARA EL AISLADO Pab6

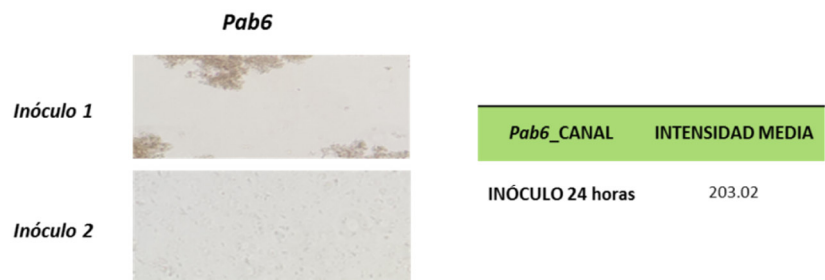


Figura 51: Como se puede observar en la imagen, el aislado 6 no tuvo crecimiento en forma de biofilm. La intensidad media medida para el inóculo 2 (24 horas) fue prácticamente igual que el control negativo.

3.2.7-RESULTADOS PARA EL AISLADO ATCC 27853

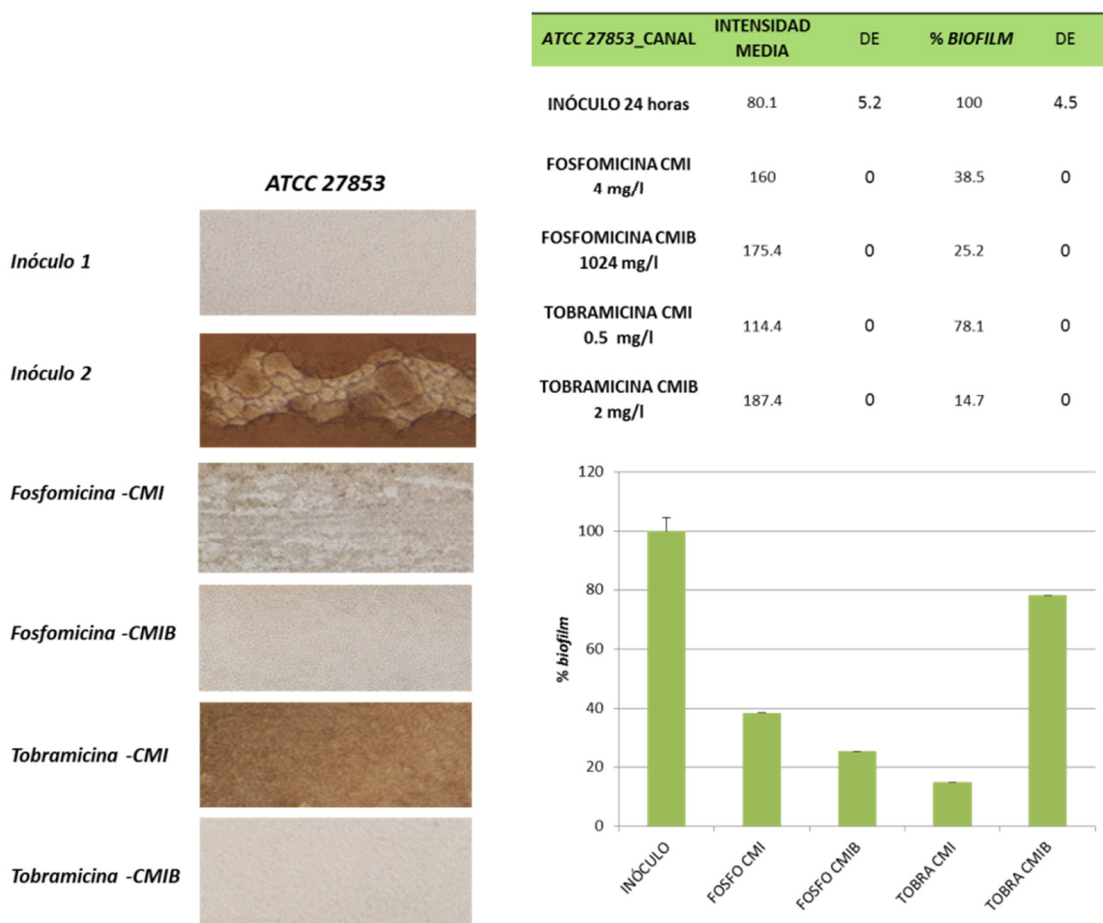


Figura 52: En la parte izquierda de la figura se muestra la imagen tomada para cada microcanal del aislado ATCC 27853. El inóculo 1 corresponde al observado a las 8 horas y el inóculo 2 el observado a las 24 horas. En la tabla se muestran los resultados de la intensidad media para cada experimento y su correspondiente porcentaje de biofilm remanente. En la parte inferior se muestra la representación gráfica de este porcentaje. La desviación estándar (DE) se ha calculado teniendo en cuenta las zonas de intensidad máxima dentro del microcanal.

4-DISCUSIÓN

En el curso de una infección, la formación de biopelículas por parte de los microorganismos asegura, al menos durante un tiempo, la supervivencia de una fracción importante del inóculo así como una mayor resistencia (o falta de respuesta microbiológica) a los antibióticos. Estos factores, inevitablemente repercuten negativamente en la respuesta clínica del paciente.

Se estima que alrededor del 80% de las infecciones trascurren con la formación de *biofilms* (134). En muchos casos, la existencia de estas 'comunidades bacterianas' conduce al fracaso o al menos, a un retraso de la respuesta terapéutica, tanto por la mala penetración del antibiótico (y de los componentes defensivos del sistema inmunitario) como por la menor actividad de los mismos en su interior. Por tanto, el uso de antimicrobianos convencionales que actúan como bactericidas sobre células planctónicas, puede que no consiga inhibir o erradicar el mismo microorganismo cuando gran parte de sus células crece en forma sésil. Ante este hecho ampliamente constatado, es fundamental abordar el estudio de la actividad de los antibióticos con modelos *in vitro/in vivo* que simulen este tipo de crecimiento y, consecuentemente, el desarrollo de alternativas terapéuticas para combatir las infecciones en las que el *biofilm* esté ciertamente implicado.

P. aeruginosa es una de las especies que más comúnmente crece formando biopelículas y entre otras infecciones, este tipo de estructura adquiere una gran relevancia en la infección pulmonar de pacientes con fibrosis quística. En torno al 54% de los pacientes menores de 18 años con esta enfermedad están colonizados-infectados de forma intermitente o crónica con esta especie, mientras que ese porcentaje se eleva al 81% en pacientes mayores de 18 años (135).

Un paso crítico para el avance y cronificación de la infección es la formación del *biofilm*, que en el caso mencionado, está favorecida por la conversión de *P. aeruginosa* al fenotipo mucoso.

Por otra parte, se ha demostrado que esta forma de crecimiento también incrementa la mutagénesis. Dentro del *biofilm* existen microambientes heterogéneos debido a la deficiente difusión de oxígeno y de nutrientes. Tanto el sistema inmunitario, mediante las especies reactivas de oxígeno y los anticuerpos, como los antibióticos, se limitan a tener una actividad adecuada en la superficie del *biofilm*, mientras que a las zonas más profundas solo llegan concentraciones subinhibitorias, lo que favorece la aparición de mutaciones en parte de la población bacteriana (136).

Se debe destacar, sin embargo, que durante la infección crónica hay variantes celulares - que disminuyen su capacidad para formar *biofilm* por lo que ésta no sería condición *sine qua non* para poder sobrevivir y permanecer en este tipo de estructura (137).

Los modelos *in vitro* para la formación de *biofilms*, deben contribuir a predecir el éxito terapéutico frente a microorganismos que presenten este tipo de crecimiento. Se ha discutido sobre cuál es la técnica más adecuada para el desarrollo *in vitro* del *biofilm*, sin embargo, como hemos demostrado en nuestro trabajo, las técnicas cerradas y las técnicas abiertas pueden resultar complementarias.

En los sistemas cerrados se acumulan metabolitos de desecho y los nutrientes disponibles son limitados, lo que puede inducir a resultados equívocos. No obstante, son sistemas de alto rendimiento que permiten el cálculo de parámetros PD. Por su parte, los sistemas abiertos reproducen mejor los modelos *in vivo*, pero son más caros y su ejecución es más laboriosa. Estos sistemas abiertos son muy útiles para establecer la dinámica del *biofilm* en presencia de nuevos antibióticos y de combinaciones de los mismos, con lo que se pueden determinar también parámetros PK/PD. En este aspecto, el equipo *Bioflux* tiene todas las ventajas de los modelos abiertos ya que, a la vez que proporciona un alto rendimiento, hay menos posibilidad de contaminaciones y resulta más fácil de obtener el *biofilm*.

Sin embargo, en la actualidad no se utiliza ningún modelo en la rutina de los laboratorios clínicos de microbiología. Es necesario establecer un método que pueda determinar la sensibilidad antibiótica en un modelo de *biofilm*, que aporte resultados extrapolables, al menos parcialmente, a las situaciones clínicas, mediante parámetros como CMIB, CMEB y CMBB. Así mismo, se necesitaría que EUCAST Y CLSI estandarizaran procedimientos, parámetros y puntos de corte adaptados a la actividad de los antimicrobianos en los *biofilms*.

En este capítulo se detallan y se discuten los resultados obtenidos de la actividad de la combinación de fosfomicina/tobramicina en *biofilms* de *P. aeruginosa* creados con dos modelos: uno cerrado y otro abierto. Con el método *Calgary* se encontró que todos los aislados, excepto uno de ellos (*Pab6*), formaron *biofilm*. Esto mismo fue confirmado con el método abierto, donde, para el aislado *Pab6*, tras 24 horas, no se observó crecimiento en forma de biopelícula. Esta cepa se aisló de un paciente con fibrosis quística, con infección crónica por *P. aeruginosa* de morfotipo puntiforme. Se corroboró por tanto, que la capacidad para formar *biofilm*, no es requisito indispensable para poder mantener una infección crónica y

que esta condición, incluso, se puede llegar a perder a lo largo del tiempo, o al menos en parte - de la población (138).

Según los métodos *in vitro* utilizados en este estudio, fosfomicina no es capaz de inhibir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* ni de erradicarlas una vez establecidas. Sin embargo, su asociación con tobramicina ha demostrado ser sinérgica en la inhibición del *biofilm*. En el modelo abierto se observó que la combinación de fosfomicina-tobramicina, consigue el mismo efecto que la tobramicina, pero con una concentración menor de tobramicina. Así mismo se ha demostrado que determinadas concentraciones antibióticas capaces de inhibir el crecimiento de células planctónicas, son incapaces de inhibir dicho crecimiento cuando forma parte de un *biofilm*. Por ello es importante que la concentración que llegue al *biofilm* sea elevada. Este objetivo se consigue en gran medida con la terapia inhalada que reciben los pacientes con fibrosis quística.

Tobramicina es capaz de **prevenir la aparición del *biofilm*** aun a concentraciones muy bajas, mientras que fosfomicina presenta un comportamiento diferente en cada cepa.

En varios estudios, *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado la actividad sinérgica de la combinación de fosfomicina con tobramicina sobre el *biofilm*.

Anderson *et al.* comprobaron que la asociación de fosfomicina-tobramicina en proporción 4:1 era capaz de erradicar *biofilms* de *P. aeruginosa* crecidos en células de vía aérea de pacientes con fibrosis quística, a concentraciones que se alcanzan fácilmente por vía inhalada (13). La actividad que esta combinación tiene sobre *biofilms* formados, así como en la inhibición de la formación de nuevos *biofilms*, fue comparable a la de la tobramicina, con la ventaja de alcanzar el mismo efecto con menor concentración de tobramicina, pudiendo evitar así efectos adversos. Del mismo modo que hemos observado con nuestros modelos, la fosfomicina por sí sola tuvo una actividad muy escasa sobre el *biofilm*, que puede ser debida a su mecanismo de acción inhibiendo la síntesis de la pared celular en bacterias que crecen activamente, y que dentro del *biofilm* tienen un metabolismo más lento. La fosfomicina ha demostrado tener una alta tasa de penetración en *biofilms* maduros de *P. aeruginosa* (139), y su actividad sería la de potenciar la penetración de tobramicina al interior celular (127). Así mismo, se ha señalado que la combinación de fosfomicina-tobramicina podría inhibir el sistema de secreción tipo III y otros mecanismos de virulencia de *P. aeruginosa* dentro del *biofilm* (13).

La combinación de aminoglucósidos (amicacina o isepamicina) con fosfomicina ha demostrado actividad sinérgica en un modelo animal de infección mediada por *biofilm*, así como la disminución de marcadores inflamatorios como la proteína C-reactiva y el número de leucocitos (140). Actualmente hay un ensayo clínico en ejecución para evaluar la eficacia de la

combinación de ampicilina-fosfomicina en pacientes con ventilación mecánica para profilaxis o tratamiento de neumonía (NCT01969799).

La efectividad de la fosfomicina-tobramicina para inhalación fue evaluada en un estudio doble ciego, aleatorizado, placebo-control en pacientes con fibrosis quística (12). Se utilizaron 2 esquemas de dosificación de fosfomicina-tobramicina: 80/20 mg o 160/40 mg, ambos administrados dos veces al día. En los dos grupos se mantuvo la mejoría en el FEV₁ que se logró con la administración inicial de aztreonam inhalado, con diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo placebo. Además en el grupo que utilizó 80/20 mg, hubo una reducción significativa en la densidad del inóculo de *P. aeruginosa* en el esputo comparado con el grupo control. Actualmente el desarrollo de esta combinación por parte de CURx Pharma (San Diego, EE.UU) se encuentra en fase III.

Como conclusión, los *biofilms* formados por *P. aeruginosa* están implicados en numerosas infecciones crónicas y para lograr su erradicación es necesario el desarrollo de nuevas terapias así como modelos *in vitro-in vivo* que puedan predecir fielmente la eficacia de estas terapias. La combinación de fosfomicina-tobramicina se presenta como una alternativa ventajosa para el tratamiento de la infección por *P. aeruginosa* en fibrosis quística. Se ha demostrado que los métodos *in vitro* abiertos y cerrados pueden ser complementarios a la hora de determinar la actividad que un antimicrobiano tiene sobre un *biofilm*. *Bioflux* es un sistema que se presenta como una herramienta muy útil a la hora de realizar modelos abiertos de *biofilm* de alto rendimiento.



Epílogo

EPÍLOGO

Este trabajo surge a raíz del problema de la multirresistencia bacteriana al que estamos asistiendo en estos últimos años y ante la escasez en el desarrollo de nuevas moléculas activas capaces de hacer frente a estos microorganismos.

En el caso de *P. aeruginosa*, el problema es más complejo debido a la resistencia intrínseca que presenta el propio microorganismo y a su patogenicidad.

En este contexto se está revalorizando el uso de antiguos compuestos como la fosfomicina. Este antibiótico posee unas características únicas, como su mecanismo de acción, que hace que las resistencias cruzadas con otros antibióticos sean nulas o muy poco frecuentes y permite la posibilidad de combinaciones con otros antimicrobianos. Otras ventajas que lo caracterizan son su escasa toxicidad y su amplia distribución tisular.

Sin embargo, los datos que se tienen sobre la actividad *in vitro* y sobre su uso clínico en este tipo de infecciones son escasos. En concreto frente a *P. aeruginosa* los datos son muy limitados, actualmente no hay punto de corte clínico y se discute sobre su uso para tratamiento de estas infecciones por su alta frecuencia de mutación *in vitro* y por tanto la posible aparición de mutantes resistentes durante tratamiento.

En nuestro trabajo se dan respuesta a algunas de estas cuestiones que permiten afianzar las propiedades de este antibiótico. Empezando por el estudio de la caracterización fenotípica de la resistencia, donde se han establecido las concordancias entre los métodos de determinación de sensibilidad respecto al método de referencia. La microdilución ha demostrado ser fiable y en el caso de los métodos de difusión, se ha definido un inóculo alternativo que mejora significativamente los datos de concordancia. Así, estas técnicas se podrían emplear de forma más precisa y reproducible.

Según nuestros resultados, el principal problema respecto al uso de la fosfomicina frente a *P. aeruginosa*, es la alta frecuencia de mutación que presenta. Se ha demostrado por tanto, que su administración debe ser siempre combinada, aun en aislados que pertenezcan a la población salvaje. En este aspecto, su asociación con tobramicina ha demostrado ser sinérgica y consigue disminuir el rango de la ventana de selección de mutantes resistentes tanto en aerobiosis como anaerobiosis. Así mismo, esta combinación se ha ensayado en modelos *in vitro* de *biofilm*, tanto en sistemas cerrados como abiertos, obteniendo buenos resultados y definiendo esta asociación como sinérgica en la inhibición del *biofilm*. Estos resultados avalarían por tanto su uso en infecciones que transcurren con la formación de biopelículas o en ambientes anaeróbicos, como es el caso de la fibrosis quística.

Por último, en la caracterización molecular de la resistencia, se han establecido las mutaciones en el gen *glpT* que codifica para la permeasa del glicerol 3-P. Estas mutaciones son variadas y se pueden presentar en toda la secuencia del gen, causando cambios en la proteína y truncando su actividad.

En resumen, se han estudiado distintos aspectos sobre la actividad *in vitro* de la fosfomicina frente a *P. aeruginosa* que han permitido avanzar positivamente en el conocimiento y en la utilidad de este antibiótico como alternativa en el tratamiento de estas infecciones.



Conclusiones

CONCLUSIONES -

1. - Se ha confirmado una buena correlación entre la técnica de microdilución y el método de referencia (dilución en agar) al determinar la sensibilidad de *P. aeruginosa* a fosfomicina. Sin embargo, las técnicas de difusión empleando las tiras de gradiente y los discos de antibiótico, realizados con un inóculo estándar de 0.5 McFarland, no son métodos fiables. Esto se debe a que, con este inóculo, se incluyen subpoblaciones resistentes que determinan la aparición de colonias en el interior de las elipses y los halos de inhibición que hacen que los resultados no sean reproducibles.
2. - Se ha demostrado que en la determinación de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a fosfomicina con los métodos de difusión, el uso de un inóculo alternativo de 10^6 UFC/ml mejora la concordancia con el método de referencia, los límites de lectura son bien definidos y disminuye el número de colonias en el interior de las zonas de inhibición. De este modo se logra una lectura consistente de la CMI o del diámetro del halo y se obtienen resultados más precisos y fiables.
3. - La adición de glucosa 6-P, recomendada por CLSI para la determinación de sensibilidad a fosfomicina, no es necesaria frente a *P. aeruginosa*.
4. - En aislados de *P. aeruginosa*, procedentes de fibrosis quística, que presentan resistencia de bajo nivel a tobramicina determinada por la alteración en la bomba de expulsión MexXY, la asociación de fosfomicina y tobramicina ha demostrado ser sinérgica y bactericida.
5. - La combinación de fosfomicina y tobramicina logra disminuir el rango de la ventana de selección de mutantes resistentes tanto en aerobiosis como anaerobiosis en aislados de *P. aeruginosa* sensibles a ambos antibióticos. Sin embargo, estos antibióticos por separado no consiguen prevenir la aparición de mutantes resistentes, obteniéndose altos valores de concentración preventiva de mutantes, sobre todo para la fosfomicina.
6. - En aislados con resistencia a tobramicina de alto nivel, debida a la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, la posibilidad de utilizar la combinación de tobramicina con fosfomicina queda descartada por la ausencia de sinergia y las amplias ventanas de selección de mutantes resistentes obtenidas, tanto en aerobiosis como anaerobiosis.
7. - Las mutaciones en el gen *glpT* que codifica para la permeasa del glicerol 3-P provocan resistencia a fosfomicina en *P. aeruginosa*. Para cada aislado se detectaron distintas mutaciones a lo largo de la secuencia del gen que causaron cambios en esta proteína,

- truncando de este modo su actividad. Estas mutaciones causan aumentos muy elevados de CMI, ya que no hay otra alternativa de entrada para fosfomicina en este microorganismo.
8. - Los aislados con CMI igual o por debajo del ECOFF no presentaron mutaciones en el gen *glpT*, lo que demuestra que forman parte de la población salvaje. Este hecho refuerza el concepto del ECOFF.
 9. - La capacidad para formar biofilm no sería siempre un requisito indispensable para poder mantener una infección crónica, como así se demostró para uno de los aislados de *P. aeruginosa* recuperado de una muestra respiratoria de un paciente con fibrosis quística. Esto se confirmó por ambos modelos in vitro, tanto abierto como cerrado.
 10. Fosfomicina no es capaz de inhibir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* ni de erradicarlas una vez establecidas. Sin embargo, su asociación con tobramicina ha demostrado ser sinérgica en la inhibición del *biofilm*. La combinación de fosfomicina-tobramicina, consigue el mismo efecto que la tobramicina, pero a una concentración inferior de tobramicina.
 11. Las concentraciones antibióticas capaces de inhibir el crecimiento de células planctónicas, no consiguen inhibir dicho crecimiento cuando éstas forman parte de un *biofilm* estructurado. Por ello es importante que la concentración que llegue al interior *biofilm* sea elevada.
 12. *Bioflux* es un sistema que se presenta como una herramienta muy útil a la hora de realizar modelos abiertos de *biofilm* de alto rendimiento. Como hemos demostrado en nuestro trabajo, las técnicas cerradas y las técnicas abiertas pueden resultar complementarias.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, *et al.* Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *streptomyces*. *Science*. 1969 Oct; 166(3901):122-3.
2. Roussos N, Karageorgopoulos DE, Samonis G, Falagas ME. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Dec; 34:506–15.
3. Sauermann R, Schwameis R, Fille M, Camuz ligios ML, Zeitlinger M. Cerebrospinal fluid impairs antimicrobial activity of fosfomycin *in vitro*. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Oct;64(4):821-3.
4. Phillip J. Bergena, Cornelia B. Landersdorfera, Hee Ji Leea, Jian Lia and RLN. “Old” antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. 2012 Dec;25(6):626-33.
5. VanScoy BD, McCauley J, Ellis-Grosse EJ, Okusanya OO, Bhavnani SM, Forrest A, *et al.* Exploration of the Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships for ZTI-01 Efficacy using an *in vitro* Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec; 59(12):7170-7.
6. Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson a., Goodwin J, Whalley S, Ramos-Martín V, *et al.* Pharmacodynamics of Fosfomycin: Insights into Clinical Use for Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep;59(9):5602-10.
7. Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, *et al.* Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med*. 2008 Sep; 168(17):1897-902.
8. Neuner E, Sekeres J, Hall GS, Van Duin D. Experience with fosfomycin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. 2012 Nov; 56(11):5744-8.
9. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Aug; 34(2):111-20.
10. Grayson ML, Macesic N, Trevillyan J, Ellis AG, Zeglinski PT, Hewitt NH, *et al.* Fosfomycin for Treatment of Prostatitis: New Tricks for Old Dogs. *Clin Infect Dis*. 2015 Oct; 61(7):1141-3.
11. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomycin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr ;46(7):1069–77.
12. Trapnell BC, McColley S a, Kissner DG, Rolfe MW, Rosen JM, McKevitt M, *et al.* Fosfomycin/tobramycin for inhalation in patients with cystic fibrosis with *Pseudomonas* airway infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jan; 185(2):171–8.

13. Anderson GG, Kenney TF, Macleod DL, Henig NR, O'Toole G a. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cultured airway cells by a fosfomicin/tobramycin antibiotic combination. *Pathog Dis.* 2013 Feb; 67(1):39–45.
14. Matsumoto T, Tateda K, Miyazaki S, Furuya N, Ohno A, Ishii Y. Immunomodulating effect of fosfomicin on gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Feb; 41(2):308-13.
15. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. Immunomodulatory Effect of Fosfomicin on Human B-Lymphocyte Function. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Feb; 37(2):270-5.
16. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S, Sawada M. Immunosuppressive activity of fosfomicin on human T-lymphocyte function *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Dec;37(12):2684–7.
17. Honda J, Okubo Y, Kusaba M, Kumagai M, Saruwatari N, Oizumi K. Fosfomicin (FOM: 1 R-2S-epoxypropylphosphonic acid) suppress the production of IL-8 from monocytes via the suppression of neutrophil function. *Immunopharmacology.* 1998 May ;39(2):149–55.
18. Matsumoto T, Tateda K, Miyazaki S, Furuya N, Ohno A, Ishii Y, *et al.* Fosfomicin alters lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Mar;43(3):697–8.
19. Krause R, Patruta S, Daxböck F, Fladerer P, Wenisch C. The effect of fosfomicin on neutrophil function. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Feb; 47(2):141–6.
20. Ida S, Shindoh Y, Takishima T. Effect of antibiotics on immediate hypersensitivity reactions *in vitro*: suppression of IgE-mediated histamine release from peripheral blood basophils by fosfomicin. *Microbiol Immunol.* 1987 Jan; 31(10):975–84.
21. Kim DH, Lees WJ, Kempell KE, Lane WS, Duncan K, Walsh CT. Characterization of a cys115 to asp substitution in the *Escherichia Coli* cell wall biosynthetic enzyme udp-glcnae enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomicin. *Biochemistry.* 1996 Jan; 35(15):4923–8.
22. De Smet KA, Kempell KE, Gallagher A, Duncan K, Young DB. Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomicin resistance of recombinant MurA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 1999 Nov;145 (Pt 11):3177-84
23. Jiang S, Gilpin ME, Attia M, Ting Y-L, Berti PJ. Lyme Disease Enolpyruvyl-UDP-GlcNAc Synthase: Fosfomicin-Resistant MurA from *Borrelia burgdorferi* , a Fosfomicin-Sensitive Mutant, and the catalytic role of the active site Asp. *Biochemistry.* 2011 Mar 29;50(12):2205–12.

24. McCoy AJ, Sandlin RC, Maurelli AT. *In vitro* and *in vivo* functional activity of *Chlamydia* MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomicin resistance. *J Bacteriol.* 2003 Feb;185(4):1218–28.
25. Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomicin Resistance. *Antibiotics.* 2013 Apr 16;2(2):217–36.
26. García-Lobo JM, Ortiz JM. Tn2921, a transposon encoding fosfomicin resistance. *J Bacteriol.* 1982 Jul;151(1):477–9.
27. Shimizu M, Shigeobu F, Miyakozawa I, Nakamura A, Suzuki M, Mizukoshi S *et al.* Novel Fosfomicin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates recovered in Japan in 1996. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Jul;44(7):2007–8.
28. Pakhomova S, Rife CL, Armstrong RN, Newcomer ME. Structure of fosfomicin resistance protein FosA from transposon Tn2921. *Protein Sci.* 2004 May;13(5):1260–5.
29. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci.* 1974; May 10;235(0):364–86.
30. Castañeda-García A, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, Blázquez J. The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomicin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2009 Nov;191(22):6968–74.
31. Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang D-N. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science.* 2003;301:616–20.
32. Rodríguez-Rojas A, Maciá MD, Couce A, Gómez C, Castañeda-García A, Oliver A, *et al.* Assessing the emergence of resistance: the absence of biological cost *in vivo* may compromise fosfomicin treatments for *P. aeruginosa* infections. *PLoS One.* 2010 Jan ;5(4):e10193.
33. Williams SG, Greenwood JA, Jones CW, Le L. The effect of nutrient limitation on glycerol uptake and metabolism in continuous cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 1994 Nov;140 (Pt 11):2961–9.
34. Tsay S, Brown KK, Gaudy ET, Brown IKK. Transport of Glycerol by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1971 Oct;108(1):82–8.
35. Zimmerman SB, Stapley EO, Wallick H, Baldwin R. Phosphonomycin. IV. Susceptibility testing method and survey. *Antimicrob Agents Chemother.* 1969 Jan;9:303–9.
36. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci.* 1974 May; 235:364–86.
37. Dette GA, Knothe H, Schönenbach B, Plage G. Comparative study of fosfomicin activity in MH and in tissues. *J Antimicrob Chemother.* 1983 Jun;11(6):517–24.

38. Clinical and Laboratory Standards Institute 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. M100-S24 CLSI, Wayne, PA.
39. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 4. Available at: <http://www.eucast.org>
40. Greenwood D, Coyle S, Andrew J. The trometamol salt of fosfomycin: microbiological evaluation. *Eur Urol*. 1987 Jan;13 Suppl 1:69–75.
41. Greenwood D, Jones A, Eley A. Factors influencing the activity of the trometamol salt of fosfomycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1986 Feb;5(1):29–34.
42. Andrews JM, Baquero F, Beltran JM, Gobernado M, Loza E, Vicente M V, *et al*. International collaborative study on standardization of bacterial sensitivity to fosfomycin. 1983 Oct;12(4):357–61.
43. McCaughey G, McKeivitt M, Elborn JS, Tunney MM. Antimicrobial activity of fosfomycin and tobramycin in combination against cystic fibrosis pathogens under aerobic and anaerobic conditions. *J Cyst Fibros*. European Cystic Fibrosis Society; 2012 May;11(3):163–72.
44. Greenwood D, Brown J, Edwards R. The influence of anaerobiosis on the activity of fosfomycin trometamol. *Infection*. 1992 Jan;20 Suppl 4:S305–9.
45. McCaughey G, Gilpin DF, Schneiders T, Hoffman LR, McKeivitt M, Elborn JS, *et al*. Fosfomycin and tobramycin in combination downregulate nitrate reductase genes *narG* and *narH*, resulting in increased activity against *Pseudomonas aeruginosa* under anaerobic conditions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov;57:5406–14.
46. Hardisson C, Llaneza J. The action of fosfomycin on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy*. 1977;23:37–44.
47. Morrison AJ, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*. 1984 Sep-Oct;6 Suppl 3:S627–42.
48. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec ;50(1):43–8.
49. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013 Apr;67(3):159–73.
50. Vallés J, Mariscal D. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005 Dec;23 Suppl 3:30–6.
51. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of health-care associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013.

52. Trouillet JL, Vuagnat A, Combes A, Kassis N, Chastre J, Gibert C. *Pseudomonas aeruginosa* Ventilator-Associated Pneumonia : Comparison of Episodes Due to Piperacillin-Resistant versus Piperacillin-Susceptible Organisms. 2002 Apr;34:1047–54.
53. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TFW. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2005 Aug;4 Suppl 2:37–43.
54. Irene W, Dragan T, Wrenn S. International Journal of Infectious Diseases Nosocomial Gram-negative bacteremia in intensive care : epidemiology , antimicrobial susceptibilities , and outcomes. Int J Infect Dis. Int J Infect Dis. 2015 Aug;37:129-34.
55. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Apr;49(4):1306–11.
56. Alvarez-Lerma F, Pavesi M, Calizay M, Valles J, Palomar M. Risk and prognostic factors of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in critically ill patients. Med Clin (Barc). 2001 Dec 6;117(19):721–6.
57. Chen Y-H, Ko W-C, Hsueh P-R. Emerging resistance problems and future perspectives in pharmacotherapy for complicated urinary tract infections. Expert Opin Pharmacother 2013 Apr;14(5):587–96.
58. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nat Rev Microbiol. 2009 Sep;7(9):654–65.
59. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol. 2009 Jun;44(6):547–58.
60. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Médecine Mal Infect. 2006 Feb;36(2):78–91.
61. King JD, Kocíncová D, Westman EL, Lam JS. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Innate Immun. 2009 Oct;15(5):261–312.
62. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002 Sept;8(9):881–90.
63. Lieleg O, Caldara M, Baumgärtel R, Ribbeck K. Mechanical robustness of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Soft Matter. 2011;7(7):3307-3314.
64. Tolker-Nielsen T, Molin S. Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. Microb Ecol. 2000;40(2):75–84.
65. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. Biomed Res Int.;2015:759348

66. Hassett DJ, Sutton MD, Schurr MJ, Herr AB, Caldwell CC, Matu JO. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. Trends Microbiol. 2009 Feb;17:130–8.
67. Macia MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. Clin Microbiol Infect. 2014 Oct;20(10):981-90.
68. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. J Clin Microbiol. 1999 Jun;37(6):1771-6.
69. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis. J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):1915–22.
70. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, *et al.* Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol Microbiol. 2003 Jun;48(6):1511–24.
71. Donlan RM, Priede J a, Heyes CD, Sanii L, Murga R, Edmonds P, *et al.* Model System for Growing and Quantifying *Streptococcus pneumoniae* Biofilms In Situ and in Real Time. Appl Environ Microbiol. 2004 Aug;70(8):4980–8.
72. Benoit MR, Conant CG, Ionescu-zanetti C, Schwartz M, Matin A. New Device for High-Throughput Viability Screening of Flow Biofilms. Appl Environ Microbiol. 2010 Jul;76(13):4136-42.
73. Stover CK, Pham XQ, Erwin a L, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000 Aug;406:959–64.
74. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, Argenio DAD, *et al.* Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 May;103(22):8487-92.
75. Sobel ML, McKay GA, Poole K. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Oct;47(10):3202–7.
76. Fraud S, Poole K. Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Mar;55(3):1068–74.
77. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Mar ;55(3):1211–21.

78. Kohlenberg A, Weitzel-Kage D, van der Linden P, Sohr D, Vögeler S, Kola A, *et al.* - Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a surgical intensive care unit. J Hosp Infect. 2010 Apr;74(4):350–7.
79. Naze F, Jouen E, Randriamahazo RT, Simac C, Laurent P, Blériot A, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus. J Clin Microbiol. 2010 Sep;48(9):3146–52.
80. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. Curr Opin Infect Dis. 2008 Aug;21(4):367–71.
81. Goossens H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: Results from the European MYSTIC study group. Clin Microbiol Infect. 2003 Sep;9(9):980–3.
82. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science. 2000 May;288(5469):1251–4.
83. Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blázquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Nov;48(11):4226–33.
84. Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, *et al.* Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the Triazoles and Six *Aspergillus* spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document). J Clin Microbiol. 2010 Jun;48(9):3251–7.
85. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. J Clin Microbiol. 2014 Dec;52(12):4124–8.
86. García-Castillo M, Del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, *et al.* Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. J Clin Microbiol. 2011;49(8):2905–10.
87. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ TR. Cumitech 31A, Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Coordinating ed, Sharp SE ASM Press, Washington, DC. 2009
88. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet. 1986 Feb;1(8476):307–10.

89. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. - Biometrics. 1977 Mar;33(1):159–74.
90. Goto S. Fosfomycin, antimicrobial activity in vitro and in vivo. Chemotherapy. 1977;23 Suppl 1:63–74.
91. Horii T, Kimura T, Odagiri T, Shibayama K, Ohta M. Medium compositions and culture conditions for the assay of fosfomycin susceptibility by Etest. J Infect Chemother. 2000 Mar;6(1):30–4.
92. Yoshio K, Sumitani Y, Kayoko S, Naoki A. Antimicrobial activity of fosfomycin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Int J Antimicrob Agents. 2007 Dec;30(6):563–4
93. Nelson JL, Harmon ME, Robergs R a. Identifying plasma glycerol concentration associated with urinary glycerol excretion in trained humans. J Anal Toxicol. 2011 Dec;35:617–23.
94. Sastry S, Doi Y. Fosfomycin: Resurgence of an old companion. J Infect Chemother. 2016 May;22(5):273–80.
95. Rajenderan S, Balaji V, Anandan S, Sahni RD, Tansarli GS, Falagas ME. Determination of MIC distribution of arbekacin, cefminox, fosfomycin, biapenem and other antibiotics against gram-negative clinical isolates in South India: A prospective study. PLoS One. 2014 Jul 28;9(7):e103253
96. de Cueto M, Hernández JR, López-Cerero L, Morillo C, Pascual A. In Vitro Activity of Fosfomycin against Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Comparison of Susceptibility Testing Procedures. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006 Dec;24(10):613–6.
97. López-Cerero L, de Cueto M, Díaz-Guerrero MA, Morillo C, Pascual A. Evaluation of the Etest method for fosfomycin susceptibility of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2007 Apr;59(4):810–2.
98. Traub WH, Spohr M. Fosfomycin: interpretation of inhibition zones obtained with the Bauer-Kirby agar disk diffusion susceptibility test. Chemotherapy. 1983;29(3):208–12.
99. Matsen JM, Koepcke MJ, Quie PG. Evaluation of the Bauer-Kirby-Sherris-Turck single-disc diffusion method of antibiotic susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 1969;9:445–53.
100. Morosini M-I, Loza E, Gutiérrez O, Almaraz F, Baquero F, Cantón R. Evaluation of 4 swab transport systems for the recovery of ATCC and clinical strains with characterized resistance mechanisms. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Sep;56(1):19–24.

101. Rodríguez-Rojas A, Couce A, Blázquez J. Frequency of spontaneous resistance to fosfomycin combined with different antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Nov;54(11):4948–9.
102. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, *et al*. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2000 May;38(5):1818-22.
103. Andrews JM, Baquero F, Beltran JM, Canton E, Crokaert F, Gobernado M, *et al*. International collaborative study on standardization of bacterial sensitivity to fosfomycin. J Antimicrob Chemother. 1983 Oct;12(4):357-61
104. Holloway BW. Genetics of *Pseudomonas*. Bacteriol Rev. 1969 Sep;33(3):419-43..
105. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents—Approved Standard M26-A. Wayne, PA, USA: NCCLS; 1999.
106. Gobernado M. Fosfomycin. Rev Esp Quimioter. 2003 Mar;16(1):15–40.
107. Alvarez F, Olaechea P, Grau S, Marín M, Domínguez A, Martínez-Lanao J, *et al*. Recommendations for antibiotic monitoring in ICU patients. Farm Hosp. Jan;32(2):113–23.
108. Wise R, Dyas A, Hegarty A, Andrews JM. Pharmacokinetics and tissue penetration of aztreonam. Antimicrob Agents Chemother. 1982 Dec;22(6):969-71.
109. Michalopoulos AS, Falagas ME. Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. Ann Intensive Care. 2011 Aug 2;1(1):30.
110. Ljungberg B, Nilsson-Ehle I. Pharmacokinetics of Meropenem and its metabolite in young and elderly healthy men. Antimicrob Agents Chemother. 1992 Jul;36(7):1437-40.
111. Wise R, Lockley RM, Webberly M, Dent J. Pharmacokinetics of intravenously administered ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 1984 Aug;26(2):208–10.
112. Blondeau JM, Zhao X, Hansen G. Mutant Prevention Concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Feb;45(2):433-8.
113. McCaughey G, Diamond P, Elborn JS, McKevitt M, Tunney MM. Resistance development of cystic fibrosis respiratory pathogens when exposed to fosfomycin and tobramycin alone and in combination under aerobic and anaerobic conditions. PLoS One. 2013 Jan;8(7):e69763.
114. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 2003;52(June):11–7.

115. Maciá MD, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Detection and Susceptibility Testing of - Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Strains with the Etest and Disk Diffusion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul;48(7):2665-72.
116. Vila J, Francesc M. Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Dec;28(10):726-36.
117. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance Mechanisms of Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Germany and Correlation with Hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Nov;51(11):4062-70.
118. Hocquet D, Bertrand X, Ko T, Talon D, Ple P. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jun;47(6):1887-94.
119. Aires JR, Köhler T, Nikaido H. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Nov;43(11):2624-8.
120. Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu X-H, Falagas ME. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Feb;67(2):255–68.
121. Apisarnthanarak A, Mundy LM. Use of high-dose 4-hour infusion of doripenem, in combination with fosfomycin, for treatment of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2010 Dec 1;51(11):1352-4.
122. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 May;31(5):695–701.
123. Lima DAF dos S, Nascimento MMP do, Vitali LH, Martinez R. *In vitro* activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 May-Jun;46(3):299-303.
124. Gómez-Garcés J-L, Gil-Romero Y, Sanz-Rodríguez N, Muñoz-Paraíso C, Regodón-Domínguez M. *In vitro* activity of fosfomycin, alone or in combination, against clinical isolates of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016 Apr;34(4):228-31.
125. Mikuniya T, Kato Y, Kariyama R, Monden K, Hikida M, Kumon H. Synergistic effect of fosfomycin and fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Acta Med Okayama*. 2005 Oct;59(5):209-16.

126. Field TR, White A, Elborn JS, Tunney MM. Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* grown planktonically and as biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Oct;24(10):677–87.
127. MacLeod DL, Velayudhan J, Kenney TF, Therrien JH, Sutherland JL, Barker LM, *et al*. Fosfomycin enhances the active transport of tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1529–38.
128. Yanagida C, Ito K, Komiya I, Horie T. Protective effect of fosfomycin on gentamicin-induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2004 Jul ;148(3):139–47.
129. Guénard S, Muller C, Monlezun L, Benas P, Broutin I, Jeannot K, *et al*. Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):221–8.
130. Garcia L. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. *Handbook* Washington, DC Am Soc. American Society of Microbiology; 1992;1–23.
131. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003 June;52:1.
132. Reffuveille F, De La Fuente-Núñez C, Mansour S, Hancock REW. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Sep;58(9):5363–71.
133. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Maiz L, Lamas A, Baquero F, Cantón R. *In vitro* prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Aug;40(2):173–6.
134. Tolker-nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections : From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS Suppl*. 2014 Dec;(138):1-51.
135. de Dios Caballero J, del Campo R, Royuela A, Solé A, Maiz L, Oliveira C, *et al*. Bronchopulmonary infection-colonization patterns in Spanish cystic fibrosis patients: Results from a national multicenter study. *J Cyst Fibros*. 2016 May;15(3):357-65.
136. Rodríguez-Rojas A, Oliver A, Blázquez J. Intrinsic and environmental mutagenesis drive diversification and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections. *J Infect Dis*. 2012 Jan;205(1):121–7.
137. Lee HJ, Bergen PJ, Bulitta JB, Tsuji B, Forrest A, Nation RL, *et al*. Synergistic activity of colistin and rifampin combination against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* . 2013 Aug;57(8):3738–45.

- 138.** Lee B, Haagensen JAJ, Ciofu O, Bo J, Høiby N, Molin S, *et al.* Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5247–55.
- 139.** Rodríguez-Martínez JM, Ballesta S, Pascual A. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Oct;30(4):366-8.
- 140.** Cai Y, Fan Y, Wang R, An M, Liang B. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa in vitro* and biofilm infections in a rat model. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64(3):563-6.

